

Der Einfluß des Zeitfaktors auf die
Toxizität von Methotrexat in weiblichen
C₃H-Mäusen

Josef Ruf

1981

Aus dem Strahlenbiologischen Institut
der
Universität München
Direktor: N.N.

Der Einfluß des Zeitfaktors auf die Toxizität
von Methotrexat in weiblichen C_3H - Mäusen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten
Medizin an der Ludwig Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt von

Josef R u f
aus
Dillingen-Donau

München 1981

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. K.R. Trott

Mitberichterstatter: Prof. Dr. W. Wilmanns

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Februar 1981



Meinen Dank möchte ich Herrn Professor Dr. Trott für die Überlassung des Themas und die Betreuung bei der Durchführung der Versuche aussprechen.

Weiterhin danke ich den Mitarbeitern des Strahlenbiologischen Instituts, besonders Frau Dr. Eichholz-Wirth und Herrn Dr. Kummermehr, für die wertvollen Ratschläge und Anregungen.

Inhaltsverzeichnis:

	Seite
1. Einleitung	1
2. Material und Methode	3
2.1. Versuchstiere und deren Haltung	3
2.2. Methotrexat	3
2.3. Leucovorin	4
2.4. Hanks-Lösung	4
2.5. Behandlung der Tiere mit MTX bzw. LCV	4
2.6. Gewichtskontrollen	5
2.7. Knochenmarkstransplantation	5
2.8. Tumortransplantation	6
2.9. Histologie	6
3. Ergebnisse	7
3.1. Untersuchung der Wirkung von MTX-Einzeldosen	7
3.2. Fraktionierte Anwendung von MTX	9
3.2.1.1. Applikation von MTX in zwei Fraktionen bei verschiedener Dosierung und Variation des Zeitintervalls	9
3.2.1.2. Symptomatik der Nebenwirkungen nach MTX-Behandlung	18
3.2.1.3. Kontrolle des Gewichtsverlaufs	18
3.2.2. Untersuchung über den Einfluß der Fraktionierung und Protrahierung auf die Letalität	21
3.2.3. Wirkung geringer MTX-Dosen bei Gabe in drei Fraktionen über einen längeren Zeitraum	23
3.2.4. Untersuchung über die Wirkung von MTX bei fünffacher Fraktionierung	25
3.3.1. Untersuchung der Wirkung fraktionierter MTX-Gaben mit anschließender Leucovorin-Gabe	25
3.3.2. Testung der Wirkung von Leucovorin bei zeitlich differenter Gabe nach MTX	32
3.3.3. Testung der MTX-Wirkung mit nachfolgender Leucovorin-Gabe bei wiederholter Anwendung	35
3.4. Bestimmung der MTX-Toxizität nach fraktionierter Gabe mit nachfolgender Knochenmarkstransplantation	39
3.5. Histologische Untersuchung der MTX-Schäden am Darm nach Gabe einer letalen fraktionierten MTX-Dosis	41

4.	Diskussion	44
4.1.1.	Struktur und Hemmungsmechanismus von MTX	44
4.1.2.	Pharmakologisches Verhalten von MTX	46
4.1.2.1.	Applikation	46
4.1.2.2.	Transportmechanismus	46
4.1.2.3.	Serumspiegel beim Menschen	47
4.1.2.4.	Serumspiegel von MTX bei der Maus	48
4.1.2.5.	Ausscheidung und Metabolismus beim Menschen	48
4.1.2.6.	Ausscheidung von MTX bei der Maus	49
4.1.2.7.	Nebenwirkungen von MTX	50
4.1.3.	Leucovorin - Wirkungsweise und Anwendungsbereiche	51
4.1.4.	Interaktionen zwischen MTX und LCV	52
4.2.	Diskussion der eigenen Ergebnisse	53
4.2.1.	Abhängigkeit der MTX-Wirkung von der Dosis	53
4.2.2.1.	Abhängigkeit der MTX-Wirkung von der Fraktionierung	55
4.2.2.2.	Einfluß von LCV auf die Toxizität fraktionierter MTX-Gaben	58
4.2.2.3.	Einfluß der Knochenmarkstransplantation auf die Letalität nach fraktionierter MTX-Gabe	59
4.3.1.	Pathophysiologie der toxischen Wirkung	61
4.3.2.	Proliferation der Dünndarmschleimhaut	63
4.3.3.	Zelluläre Erklärung der MTX Toxizität	65
4.3.4.	Vergleich der Strahlenwirkung auf den Darm	69
5.	Zusammenfassung	70
	Abkürzungsverzeichnis	72
	Literaturverzeichnis	73

1. Einleitung

Den Ausgangspunkt für die zytostatische Tumorthherapie mit Antimetaboliten bildete die Synthese von Folsäureantagonisten. Die ersten Arbeiten hierzu führten zur Herstellung von Aminopterin, das nach Beobachtungen von Farber et al. (1948) den Verlauf akuter kindlicher Leukämien günstig beeinflusste. Allerdings wurde der Einsatz dieser Substanz wegen der hohen Toxizität und der relativ gefährlichen Nebenwirkungen äußerst stark eingeschränkt.

So war die Synthese von Amethopterin durch Seeger et al. 1949 wegen der im Vergleich zu Aminopterin bedeutend geringeren Toxizität ein großer Fortschritt für die Chemotherapie von Neoplasmen. Auch diese Substanz wurde von Farber et al. in die Klinik eingeführt und erfolgreich bei akuten Leukämien erprobt. Unter dem Handelsnamen Methotrexat kam Amethopterin auf den Markt und es ist heute der einzige Folsäureantagonist, der in der Therapie Verwendung findet.

Trotz der mit diesem Medikament erzielten Erfolge bilden die generalisierte Wirkung auf den Organismus und die geringe therapeutische Breite ein ernstes Problem für die klinische Anwendung. So muß schon bei therapeutischen Dosen mit einer Depression der Knochenmarksfunktion, mit einer Schädigung der intestinalen Schleimhäute, der Gonaden und Haarwurzeln gerechnet werden. Bei Anwendung während der Schwangerschaft bleiben Schäden beim Föten, die bis zum Absterben der Frucht führen können, nicht aus.

Die folgenschweren Begleiterscheinungen dieser Substanz erfordern deshalb eine äußerst genaue Kenntnis ihrer Auswirkungen in vivo unter den verschiedensten Anwendungsbedingungen. Nur das exakte Wissen über Wirkungen und Nebenwirkungen ermöglicht es schließlich, Wege zur Optimierung der Tumorthherapie zu erlangen.

In der vorliegenden Arbeit wurde Methotrexat (MTX) in vivo an Mäusen getestet. Es war dabei das Ziel, die letale Wirkung des Medikamentes in Abhängigkeit von Dosis, Fraktionierung und Protrahierung zu untersuchen. Außerdem sollte Aufschluß darüber erhalten werden, wie sich der letale Effekt von MTX durch die Gabe des Antidots Leucovorin (LCV) in verschiedenen Dosierungs- und Fraktionierungsschemen verringern ließe und welchen Einfluß eine Knochenmarkstransplantation auf die Medikamentenwirkung habe.

2. Material und Methode

2.1 Versuchstiere und deren Haltung

Für die Untersuchungen wurden weibliche Inzuchtmäuse aus einer spezifisch-pathogen-freien Zucht des Stammes C₃H im Alter von 7 - 10 Wochen und mit einem Gewicht von 18 - 23 Gramm verwendet. Die Gesamtzahl der Tiere betrug 523. Auf 178 Versuchstiere wurden Tumoren (Adenocarcinom oder Fibrosarkom) transplantiert. (Siehe Seite 6).

Die Tiere wurden im offenen Tierstall untergebracht und für einen Zeitraum von mindestens 24 Stunden adaptiert bevor sie für die Versuche verwendet wurden. Entsprechend der Anzahl der Versuchstiere in den einzelnen Versuchsgruppen wurden die Mäuse in Käfigen mit einer Größe von 50 x 30 x 20 cm gehalten. Niemals waren aber mehr als 10 Tiere in einem Käfig. Als Spreu wurden Holzspäne benutzt. Die Raumtemperatur wurde in den Tierställen zwischen 22 und 25°C gehalten. Standardisiertes Trockenfutter und Wasser erhielten die Tiere ad libitum.

2.2 Methotrexat

MTX wurde als Trockensubstanz in Injektionsflaschen von der Firma Lederle Cyanamid GmbH Wolfratshausen bezogen. Die entsprechenden Verdünnungen wurden mit sterilem aqua bidest. hergestellt.

Eine Injektionsflasche enthielt 5,48 mg bzw. 54,8 mg MTX-Dinatrium in Form von Trockensubstanz, entsprechend 5 mg bzw. 50 mg Methotrexat. Die Injektionsflaschen enthielten keine Konservierungsstoffe.

2.3 Leucovorin

Benutzt wurden Ampullen zu 1 ml. Ebenso wie MTX stammte auch LCV von der Firma Lederle Cyanamid GmbH Wolfratshausen. Verdünnungen wurden ebenfalls mit aqua bidest. hergestellt. Eine Ampulle zu 1 ml enthielt 3,24 mg Calciumfolinat (wasserfrei) entsprechend 3 mg Folinsäure (wasserfrei), sowie als Konservierungsmittel 0,8 mg p-Hydroxybenzoesäuremethylester und 0,2 mg p-Hydroxybenzoesäurepropylester.

2.4 Hanks-Lösung

Als Suspensionslösung für die Knochenmarkzellen bei der Knochenmarktransplantation wurde Hanks-Lösung verwendet.

Die Lösung enthielt (mg/l):

NaCl	8000	CaCl ₂ H ₂ O-frei	140
Na ₂ HPO ₄ :2H ₂ O	60	Glucose	1000
KH ₂ PO ₄	60	Phenolrot	10
MgSO ₄ :7H ₂ O	200		

2.5 Behandlung der Tiere mit MTX bzw. Leucovorin

MTX und Leucovorin wurden intraperitoneal injiziert. Die Konzentrationen der Medikamente wurden dabei so gehalten, daß eine Maus pro Injektion höchstens ein Volumen von 0,5 ml gespritzt bekam. In der Regel wurde pro Maus ein Volumen von 0,01 ml/g KG gespritzt. Die Versuchstiere wurden sowohl mit Einzeldosen, als auch fraktioniert behandelt. Bei fraktionierten Gaben wurden die Dosen der einzelnen Fraktionen immer konstant gehalten.

2.6 Gewichtskontrollen

Alle Tiere wurden zu Beginn der Behandlung gewogen. Teilweise wurden die Tiere auch während und nach der Behandlung im Abstand von 24 Stunden gewogen, um den Gewichtsverlauf unter dem Einfluß von MTX bzw. MTX und Leucovorin verfolgen zu können.

2.7 Knochenmarkstransplantation

Bei der Knochenmarkstransplantation wurden für jeweils 10 Empfängertiere 3 - 4 Spendertiere verwendet. Als Spender dienten unbehandelte Tiere der selben Alters- und Gewichtsgruppe, die der Gruppe der Empfänger entsprach. Nachdem die Spender mit Chloroform abgetötet worden waren, wurden die Femora freipräpariert und entnommen. Das restliche Binde- und Muskelgewebe wurde von den Knochen durch Abreiben mit Zellstoff entfernt. Anschließend wurden die beiden Femurenden mit einer Schere abgezwickt. Aus der Knochenmarkshöhle des Femurschaftes konnten nun die Knochenmarkszellen ausgeschwemmt werden. Zur Spülung diente sterile Hanks-Lösung in einem Gesamtvolumen von ca. 1,0 bis 1,5 ml. Die Spüllösung wurde in einer Spritze aufgezogen, mit der man dann anschließend durch eine feine Kanüle die Knochenmarkszellen aus der Markhöhle des Röhrenknochen ausschwemmte. Die selbe Spüllösung wurde jeweils wieder aspiriert und für die verbliebenen Femora verwendet. Nach guter Durchmischung wurde diese Zellsuspension in einem Volumen von etwa 0,1 bis 0,15 ml intravenös den Empfängertieren injiziert. Für die Injektion wurde eine der drei Schwanzvenen benutzt, die zuvor durch Eintauchen des Schwanzes in warmes Wasser erweitert worden war.

2.8 Tumortransplantation

Das zu transplantierende Tumorgewebe wurde unter sterilen Kautelen den Spendertieren entnommen, die zuvor mit Ather abgetötet worden waren. Nach Reinigung der Tumore von Blutgefäßen und Bindegewebe wurden mit dem Skalpell Tumorstückchen von 1 mm³ Größe zugeschnitten und in steriler physiologischer NaCl-Lösung für die Transplantation bereitgehalten. Die Empfängertiere wurden zunächst an der rechten Flanke maschinell rasiert. In Äthernarkose wurde den Mäusen dann mit Hilfe einer entsprechend dicken Kanüle jeweils ein vorher präpariertes Tumorstückchen zwischen Haut und Rippen eingebracht. Im Test wurde das Adenocarcinom 284/236 und das Fibrosarkom 31/17 verwendet. Das Wachstumsverhalten der Tumore unter dem Einfluß von MTX und LCV wurde in einer anderen Arbeit von Herrn H. Gruber eingehend untersucht (siehe Literaturverzeichnis).

Die Behandlung mit den oben genannten Medikamenten wurde bei den Versuchstieren mit Tumor frühestens 10 Tage nach der Transplantation begonnen.

2.9 Histologie

Drei Tiere, die eine tödliche Dosis MTX (5 x 20 mg MTX/kg KG innerhalb 12 Std.) erhalten hatten, wurden am 5. Tag p.i. für eine histologische Untersuchung des Intestinaltraktes mit Chloroform getötet. Für die Untersuchung wurden von jedem Tier ein 1 cm langes Darmstück unterhalb des Pylorus, sowie 1 cm des distalen Colons entnommen. Die Präparate wurden in der üblichen Weise geschnitten und mit Hämalaun-Eosin bzw. Azan für die mikroskopische Untersuchung gefärbt.

3. Ergebnisse

=====

Ziel der Untersuchungen war es, die in vivo - Toxizität von MTX an C₃H-Mäusen unter verschiedenen Bedingungen zu bestimmen.

1. Untersuchung der Wirkung von MTX-Einzeldosen.
2. Test der MTX-Wirkung bei fraktionierter Applikation.
3. Untersuchung der Wirkung fraktionierter MTX-Gaben mit anschließender Leucovorin-Gabe.
4. Bestimmung der MTX-Toxizität nach fraktionierter Gabe mit nachfolgender Knochenmarkstransplantation.
5. Histologische Untersuchung der MTX-Schäden am Darm nach Gabe einer letalen MTX-Dosis.

3.1 Untersuchung der Wirkung von MTX-Einzeldosen

Zur Bestimmung der Letalität von MTX nach einmaliger Applikation wurden den Mäusen von 14 Versuchsgruppen MTX-Dosen zwischen 7 mg/kg KG und 400 mg/kg KG injiziert. Um auch letale Spätfolgen des Medikaments ausschließen zu können, wurden alle Tiere ohne Tumor über einen Zeitraum von mindestens zwei Monaten nach der MTX-Injektion beobachtet. Die Tiere mit Tumor wurden mit Chloroform abgetötet sobald der Tumor einen Durchmesser von 15 mm erreicht hatte. Dies war normalerweise zwischen dem 15. und 20. Tag nach der MTX-Injektion. Bei keinem der Versuchstiere wurde in dem angewandten Dosisbereich und während des Beobachtungszeitraums eine letale MTX-Wirkung festgestellt.

In den Dosisbereichen unter 100 mg/kg KG zeigten sich bei den Mäusen keinerlei beobachtbare Veränderungen. Über 100 mg/kg KG bekamen die Tiere am 4. Tag und 5. Tag p.i. ein struppiges Fell, waren im Bewegungsablauf im Vergleich zu unbehandelten Tieren verlangsamt und verharrten öfters in einer Kauerstellung. Diese Symptome nahmen entsprechend der Dosis zu. Zwischen 300 und 400 mg/kg KG wurde zusätzlich noch eine leichte Diarrhoe mit wässrigen Stühlen beobachtet.

Tab. 1: Applizierte Einzeldosen

Gruppe	Zahl d. Tiere	Zahl der Tiere mit Tumoren	Dosis (MTX mg/kg)	Letalität
1	8	8 Adc.	7	0
2	10	10 Adc.	14	0
3	20	10 Adc. 10 Fs.	30	0
4	10	-	50	0
5	20	10 Adc. 10 Fs.	60	0
6	10	-	75	0
7	10	-	100	0
8	10	-	125	0
9	20	10 Fs.	150	0
10	6	-	200	0
11	6	-	250	0
12	16	10 Fs.	300	0
13	6	-	350	0
14	6	-	400	0

Abkürzungen:

Adc. = Adenocarcinom

Fs. = Fibrosarkom

3.2 Fraktionierte Anwendung von MTX

Zur weiteren Untersuchung der letalen Wirkung von MTX bei C_3H -Mäusen wurde das Medikament fraktioniert verabreicht. Die Versuche wurden dabei mit verschiedenen Fraktionen, Dosen und Zeitintervallen durchgeführt.

3.2.1.1 Applikation von MTX in zwei Fraktionen bei verschiedener Dosierung und Variation des Zeitintervalls

Den Tieren in dieser Versuchsreihe wurde das Medikament in zwei Fraktionen verabreicht. Hierbei wurden drei unterschiedliche Dosierungen verwendet, die im einzelnen 10, 30 und 100 mg/kg KG je Injektion betrugen. Um den Einfluß des Zeitfaktors auf die MTX-Wirkung zu untersuchen, wurde schließlich noch das Intervall zwischen den beiden Applikationen zwischen 6 und 20 Stunden variiert.

In der Reihe mit der niedrigsten Dosierung (2x10 mg/kg) wurden drei Gruppen behandelt. Der zeitliche Abstand zwischen den beiden MTX-Gaben betrug dabei 6, 14 und 20 Stunden. Je Gruppe waren 6 Versuchstiere eingesetzt; jedoch nur 5 Tiere enthielt die Gruppe, die im Abstand von 20 Stunden behandelt wurde.

Es konnte in keinem Fall bei dieser Dosierung und den entsprechenden Intervallen eine letale Wirkung erreicht werden (siehe Tab. 2 Seite 12).

Sechs Gruppen wurden mit einer Dosis von 30 mg/kg KG behandelt. Die Fraktionierungsintervalle betrugen bei diesem Versuch 6, 8, 10, 12, 14 und 20 Stunden. Wieder waren in jeder Versuchsgruppe 6 Mäuse. Die Gruppe, die nach 20 Stunden die zweite MTX-Injektion bekam, bestand wie schon vorher nur aus 5 Tieren.

Keine letale Wirkung zeigte MTX bei den Mäusen, die im 6, 8 oder 20-stündigem Intervall behandelt wurden.

Hingegen wurde bei den Tieren, die im Abstand von 10, 12 und 14 Stunden MTX verabreicht bekamen, ein letaler

Effekt nachgewiesen. Die größte Letalität wurde, wie aus Tabelle 3 und aus Abb. 1 zu entnehmen ist, beim 12-stündigen Fraktionierungsintervall mit einer Quote von 100% erzielt. Bei 10 und 14 Stunden lagen die Ergebnisse mit 1/6 bzw. 2/6 erheblich niedriger.

In den selben zeitlichen Intervallen wie im vorigen Versuch wurden diejenigen Gruppen behandelt, die MTX in einer Dosierung von 2 x 100 mg/kg KG erhielten. Auch die Anzahl der Versuchstiere war mit der des vorangegangenen Versuchs identisch.

Kein letaler Effekt wurde beim Intervall von 6 Stunden und überraschenderweise von 12 Stunden erreicht. Dagegen betrug die Sterblichkeit, wenn die zweite MTX-Gabe nach 8 oder 10 Stunden erfolgte, jeweils 4/6. Die größte Letalität wurde mit 6/6 nach 14 Stunden erzielt. Auch nach 20 Stunden zeigte sich bei dieser Dosierung noch eine tödliche Wirkung von 2/5 (siehe Tab. 4). Um das Ergebnis nachzuprüfen, das beim Intervall von 12 Stunden erhalten worden war, wurde dieser Versuch wiederholt. Zugleich wurden auch die Ergebnisse von 10 und 14 Stunden nochmals überprüft. Pro Testgruppe wurden diesmal 10 Tiere eingesetzt.

In diesem Versuch erhielt man nun bei 10 Stunden eine Letalität von 80%. 50% der Tiere starben diesmal, wenn im Abstand von 12 Stunden gespritzt wurde, und 100% Letalität stellten sich wieder nach einem 14-stündigen Intervall ein. Zwar konnte in diesem Test bei 12 Stunden eine letale MTX-Wirkung nachgewiesen werden, sie lag aber mit 50% Letalität unter den Ergebnissen von 10 und 14 Stunden (siehe Tab. 4).

In Abb. 2 sind die Ergebnisse des ersten und des zweiten Versuchs graphisch dargestellt.

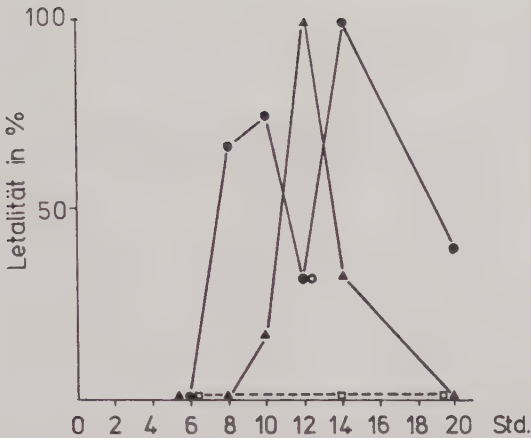


Abb. 1: Letalität nach zwei fraktionierten MTX-Gaben in Abhängigkeit vom Zeitintervall zwischen den Injektionen. □ = 2 x 10 mg MTX/kg, ▲ = 2 x 30 mg MTX/kg, ● = 2 x 100 mg MTX/kg.

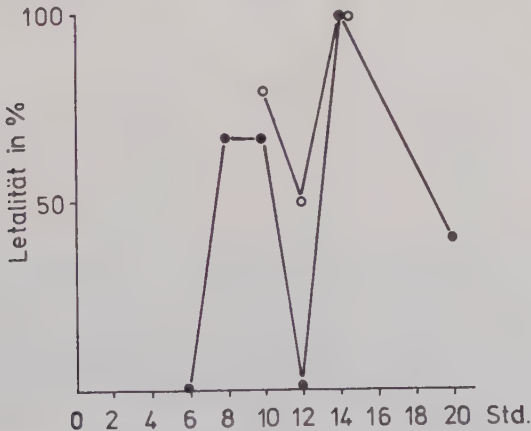


Abb. 2: Letalität aus zwei Versuchen nach zwei fraktionierten MTX-Gaben von je 100 mg/kg in Abhängigkeit vom Zeitintervall zwischen den Injektionen. ● = 1. Versuch, ○ = 2. Versuch.

Tab. 2: Letalität nach 2 x 10 mg MTX/kg KG

Fraktionsinter- vall (Std.)	Zahl der Tiere	Letalität absolut	Letalität in Prozent
6	6	0	0,0
14	6	0	0,0
20	5	0	0,0

Tab. 3: Letalität nach 2 x 30 mg MTX/kg KG

Fraktionsinter- vall (Std.)	Zahl der Tiere	Letalität absolut	Letalität in Prozent
6	6	0	0,0
8	6	0	0,0
10	6	1	16,6
12	6	6	100,0
14	6	2	33,3
20	5	0	0,0

Tab. 4: Letalität nach 2 x 100 mg MTX/kg KG

Fraktionsinter- vall (Std.)	Zahl der Tiere	Letalität absolut	Letalität in Prozent
6	6	0	0,0
8	6	4	66,6
10 (I+II)	16	12	75,0
12 (I+II)	16	5	31,3
14 (I+II)	16	16	100,0
20	5	2	40,0
10 (I)	6	4	66,6
12 (I)	6	0	0,0
14 (I)	6	6	100,0
10 (II)	10	8	80,0
12 (II)	10	5	50,0
14 (II)	10	10	100,0

Die Ergebnisse bei den Fraktionsintervallen von 10, 12 und 14 Stunden setzen sich aus den Werten des ersten und zweiten Versuchs zusammen. Die einzelnen Werte dieser beiden Versuche (I und II) sind im unteren Teil der Tabelle wiedergegeben.

I = erster Versuch

II = zweiter Versuch

In allen Versuchsgruppen dieser Testreihe starben die Tiere frühestens am 3. Tag p.i. und spätestens am 6. Tag p.i. Die höchste Rate an Todesfällen wurde am 4. Tag p.i. erreicht. Abb. 3 und 4 zeigen die Absterbekurve für die Versuche mit 2 x 30 mg MTX/kg KG und 2 x 100 mg MTX/kg KG. Die Letalität wurde kumulativ in Prozent aufgetragen.

In Abb. 5 wurde die Häufigkeit aller Todesfälle aus den vorherigen Versuchen in Prozent sowohl absolut als auch kumulativ aufgezeichnet.

Die einzelnen Absterberaten sind den Tab. 5 bis 7 zu entnehmen.

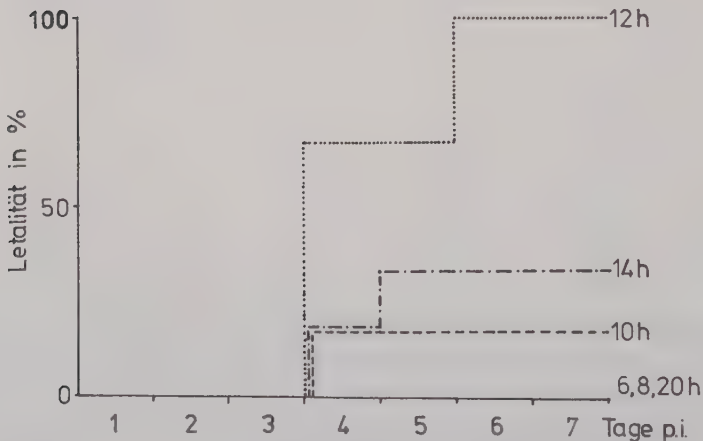


Abb. 3: Zeitliche Absterberate (kumulativ) nach zwei fraktionierten Gaben von je 30 mg MTX/kg. Die Stundenangaben entsprechen dem Intervall zwischen den Injektionen.

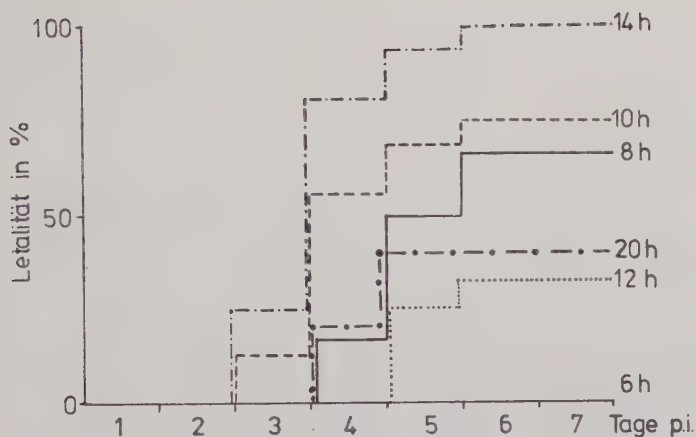


Abb. 4: Zeitliche Absterberate (kumulativ) nach zwei fraktionierten MTX-Gaben von je 100 mg/kg. Die Zeitangaben entsprechen dem Intervall zwischen den Injektionen.

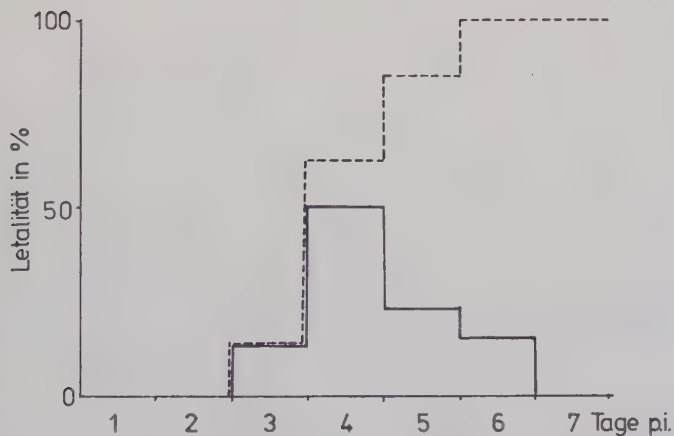


Abb. 5: Zeitliche Absterberate (kumulativ und absolut) aller Todesfälle aus 3.2.1.

Tab. 5: Letalitätsrate nach 2 x 30 mg MTX/kg KG

Tag p.i.	2	3	4	5	6	7
<u>Intervall: 6 h</u>						
Let. absolut	0	0	0	0	0	0
<u>Intervall: 8 h</u>						
Let. absolut	0	0	0	0	0	0
<u>Intervall: 10 h</u>						
Let. absolut	0	0	1	0	0	0
Let. %	0	0	16,6	0	0	0
Let. kumulativ %	0	0	16,6	16,6	16,6	16,6
<u>Intervall: 12 h</u>						
Let. absolut	0	0	4	0	2	0
Let. %	0	0	66,6	0	33,3	0
Let. kumulativ %	0	0	66,6	66,6	100,0	100,0
<u>Intervall: 14 h</u>						
Let. absolut	0	0	1	0	1	0
Let. %	0	0	16,6	0	16,6	0
Let. kumulativ %	0	0	16,6	16,6	33,3	33,3
<u>Intervall: 20 h</u>						
Let. absolut	0	0	0	0	0	0

Tab. 6: Letalitätsrate nach 2 x 100 mg MTX/kg KG

Tag p.i.	2	3	4	5	6	7
<u>Intervall: 6 h</u>						
Let. absolut	0	0	0	0	0	0
<u>Intervall: 8 h</u>						
Let. absolut	0	0	1	2	1	0
Let. %	0	0	16,6	33,3	16,6	0
Let. kumulativ %	0	0	16,6	50,0	66,6	66,6

Intervall: 10 h

Let. absolut	0	2	7	2	1	0
Let. %	0	12,5	43,8	12,5	6,3	0
Let. kumulativ %	0	12,5	56,3	68,8	75,0	75,0

Intervall: 12 h

Let. absolut	0	0	0	4	1	0
Let. %	0	0	0	25,0	6,3	0
Let. kumulativ %	0	0	0	25,0	31,3	31,3

Intervall: 14 h

Let. absolut	0	4	9	2	1	0
Let. %	0	25,0	56,3	12,5	6,2	0
Let. kumulativ %	0	25,0	81,3	93,8	100,0	100,0

Intervall: 20 h

Let. absolut	0	0	1	1	0	0
Let. %	0	0	20	20	0	0
Let. kumulativ %	0	0	20	40	40	40

Tab. 7: Gesamtletalitätsrate aus Tab. 5 und 6

Zahl aller gestorbenen Tiere 48 $\hat{=}$ 100%

Let. absolut	0	6	24	11	7	0
Let. %	0	12,5	50,0	22,9	14,6	0
Let. kumulativ %	0	12,5	62,5	85,4	100,0	100,0

3.2.1.2 Symptomatik der Nebenwirkungen nach MTX-Behandlung

Entsprechend der MTX-Wirkung bildeten sich bei den Tieren auch die Symptome der Nebenwirkungen mehr oder weniger stark aus. In den Gruppen, bei denen MTX Todesfälle verursachte, zeigten die Tiere am 2. Tag p.i. ein struppiges Fell. Ihre Bewegungen waren verlangsamt und es fiel ein gewisser Vitalitätsverlust auf. Meist verharreten die Tiere bewegungslos in einer Kauerstellung. Gleichzeitig wurde eine Diarrhoe mit schleimig schmierigen Stühlen beobachtet, denen auch teilweise Blut beigemischt war. Ferner wurde von den Tieren auch die Nahrungsaufnahme erheblich reduziert. An den folgenden Tagen verschlimmerte sich dieser Zustand und die Kachexie wurde immer deutlicher. Am 3. Tag p.i. starben in den Gruppen, bei denen MTX die größte letale Wirkung zeigte, bereits die ersten Tiere. Die Todesfälle erreichten am 4. Tag p.i. ihren Höhepunkt. Bereits am 5. und 6. Tag p.i. nahm die Zahl der gestorbenen Mäuse wieder ab. Alle Tiere, die den 6. Tag p.i. überlebt hatten, starben auch im nachfolgenden Beobachtungszeitraum von 2 Monaten nicht mehr.

3.2.1.3 Kontrolle des Gewichtsverlaufs

Bei den drei Gruppen, die zur Nachkontrolle 2 x 100 mg MTX/kg KG im Abstand von 10, 12 bzw. 14 Stunden injiziert bekommen hatten, wurde täglich der Gewichtsverlauf registriert.

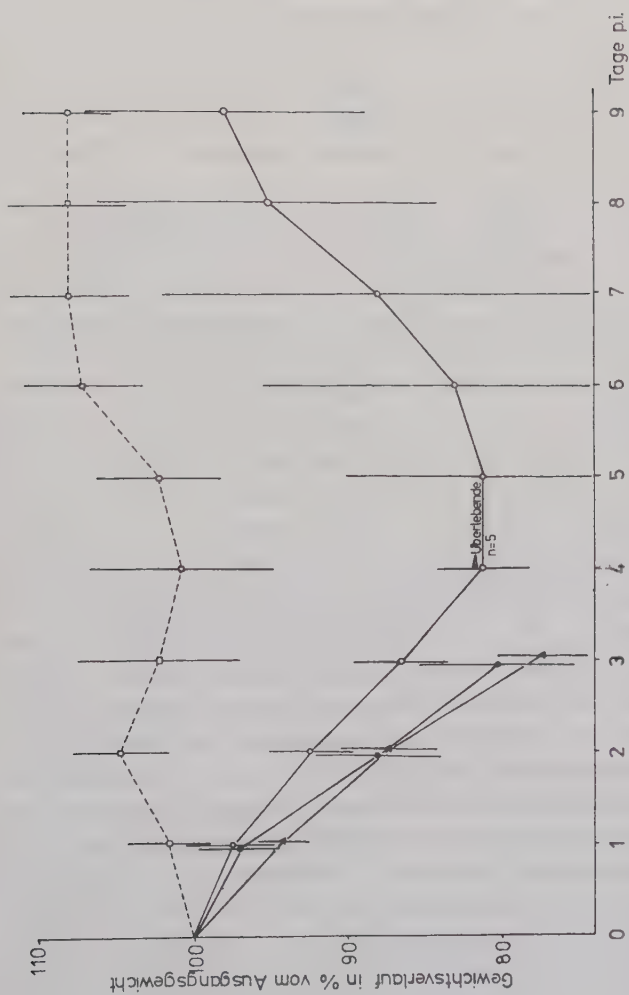


Abb. 6: Gewichtsverlauf nach 2 x 100 mg MTX/kg im Abstand von 12 Stunden. ● = 10, ○ = 12, ▲ = 14 Stunden. ---○---○ Kontrolle unbehandelt.

Der letale MTX-Effekt und der Gewichtsverlauf stehen in einem engen Zusammenhang (siehe Abb. 6). So betrug der durchschnittliche Gewichtsverlust, bei dem ein tödlicher Ausgang erwartet werden konnte, etwa 23% vom Ausgangsgewicht.

Diesen Wert hatte die Gruppe, die MTX im Abstand von 14 Stunden bekommen hatte, bereits am 3. Tag p.i. erreicht. An diesem Tag starben auch schon die ersten 4 Tiere. Dem Gewichtsverlust entsprechend erreichte auch die Gesamtletalität in dieser Testgruppe 100%. Die Gruppe, die MTX im 10-Stundenintervall injiziert bekam, geriet am 3. Tag p.i. mit 80,3% vom Ausgangsgewicht relativ nahe an den Grenzwert von 77% heran. Zwei Tiere dieser Gruppe starben noch an diesem Tag. Die Gesamtletalität betrug 80,0% (siehe Abb. 2). Flacher verläuft die Gewichtskurve der Gruppe, die nach 12 Stunden zum zweitenmal mit MTX behandelt worden war. Erst am 4. Tag p.i. hatte sie einen Wert von 81,4% erreicht; diesen Tag überlebten auch alle Tiere (siehe Abb. 4). Die Gesamtletalität der Gruppe betrug 50%. Nach dem 5. Tag p.i. setzte bei den überlebenden Tieren die Erholungsphase bereits ein, am 10. Tag p.i. hatten sie ihr Ausgangsgewicht wieder erreicht.

Alle Tiere dieser Versuchsreihe waren ohne Tumore. Um Spätfolgen der Behandlung ausschließen zu können, wurden die überlebenden Mäuse über einen Zeitraum von zwei Monaten beobachtet. Nach dem 7. Tag p.i. konnten bei den Tieren für die gesamte Beobachtungszeit keinerlei Veränderungen im Vergleich zu unbehandelten Mäusen mehr festgestellt werden.

3.2.2 Untersuchung über den Einfluß der Fraktionierung und Protrahierung auf die Letalität

In den nachfolgenden Tests wurde untersucht inwieweit Unterschiede in der Fraktionierung bzw. Protrahierung bei konstanter MTX-Dosis die letale Wirkung beeinflussen.

Im ersten Test wurden zwei Gruppen mit drei Fraktionen zu je 100 mg MTX/kg KG behandelt. Die eine Gruppe wurde jeweils im Abstand von je einer Stunde gespritzt, bei der anderen betrug das Intervall zwischen den Injektionen jeweils sechs Stunden. In jeder Versuchsgruppe waren 10 Mäuse mit Fibrosarkom.

Es starben alle Tiere, die diese MTX-Dosis über einen Zeitraum von insgesamt 12 Stunden appliziert bekommen hatten. In der anderen Gruppe, die über eine Gesamtzeit von 2 Stunden die gleiche Dosis injiziert bekommen hatte, starben dagegen nur 70% der Tiere.

Der Tod trat jeweils frühestens am 3. Tag und spätestens am 6. Tag nach der Injektion von MTX ein.

Im zweiten Versuch wurde MTX in der gleichen Gesamtdosis und über die selbe Behandlungsdauer, jedoch mit einer unterschiedlichen Anzahl an Fraktionen, angewendet. Zwei Testgruppen mit je 6 Tieren wurden mit einer Gesamtdosis von 50 mg/kg KG während eines Zeitraums von 12 Stunden behandelt. Eine Gruppe bekam 2 x 25 mg/kg KG im Abstand von 12 Stunden injiziert, der anderen Gruppe wurde 5 mal eine Dosis von 10 mg/kg KG mit einem Intervall von drei Stunden zwischen den Injektionen gespritzt. Bei beiden Gruppen wurden tägliche Gewichtskontrollen durchgeführt. Der Gewichtsverlauf (siehe Abb. 7) der Gruppen differierte kaum.

Zunächst setzte ein kontinuierlicher Gewichtsverlust ein, der am 4. Tag p.i. auf 84,8% bzw. 86,3% des Anfangsgewichts den niedrigsten Wert erreichte.

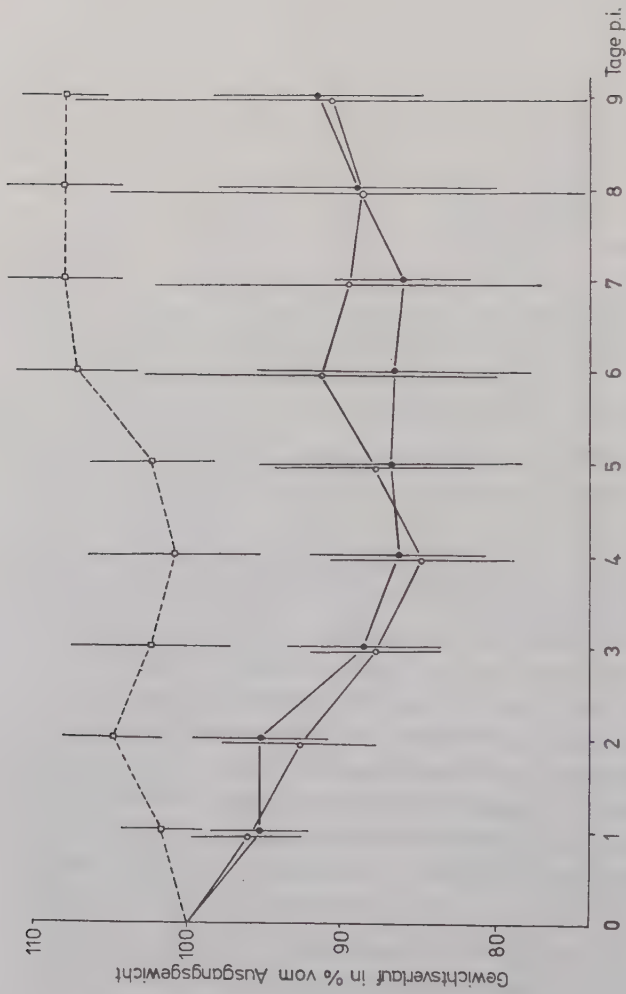


Abb. 7: Gewichtsverlauf nach 5 x 10 mg MTX/kg im Abstand von 3 Std. (●) und 2 x 25 mg MTX/kg im Abstand von 12 Std. (○). □---□ Kontrolle un-
behandelt.

Anschließend begann recht zögernd die Rekonvaleszenz. Am 9. Tag p.i. hatte die Gruppe, die zwei Fraktionen erhielt erst 90,8%, die andere Gruppe 91,6% des Ausgangsgewichtes wieder erlangt.

Letalität: Am 5. Tag p.i. starb in der Gruppe mit 5 Fraktionen eine Maus ($\hat{=}$ 16,6%). In der Gruppe mit 2 Fraktionen starben 2 Mäuse ($\hat{=}$ 33,3%), jeweils eine am 5. und 10. Tag p.i.

3.2.3 Wirkung geringer MTX-Dosen bei Gabe in drei Fraktionen über einen längeren Zeitraum

Zwei Testgruppen mit je 10 Versuchstieren wurden dreimal im Abstand von jeweils 24 Stunden mit geringen MTX-Dosen behandelt. Die Dosen jeder Injektion betrugen 7 mg bzw. 12 mg/kg KG. Tägliche Gewichtskontrollen wurden durchgeführt.

Keines der Versuchstiere starb durch die Behandlung. Dennoch können durch die Werte des Gewichtsverlaufs deutliche Rückschlüsse auf die Toxizität des Medikaments gemacht werden (siehe Abb. 8).

Überhaupt keine Gewichtsabnahme verursachte MTX, wenn es in einer Dosis von 3 x 7 mg/kg KG angewendet wurde. Während der ersten beiden Tage (ab der 1. Injektion) blieb das Gewicht stabil. Am dritten Tag (= 1. Behandlungsfreier Tag!) erfolgte ein leichter Anstieg, der sich schließlich am vierten Tag noch verstärkte. Das Ausgangsgewicht wurde auch während der folgenden Zeit nie unterschritten.

Im Gegensatz hierzu bewirkte eine Erhöhung der Dosis um das 1,7-fache auf 3 x 12 mg/kg KG einen beachtlichen Gewichtsverlust. Nach einer leichten Schulterung am ersten Tag, zeigt die Kurve eine lineare Gewichtsabnahme bis zum dritten Tag. Am vierten Tag erfolgte, parallel zur anderen Gruppe, eine rasche Gewichtszunahme. Das Ausgangsgewicht war am fünften Tag bereits wieder überschritten worden.

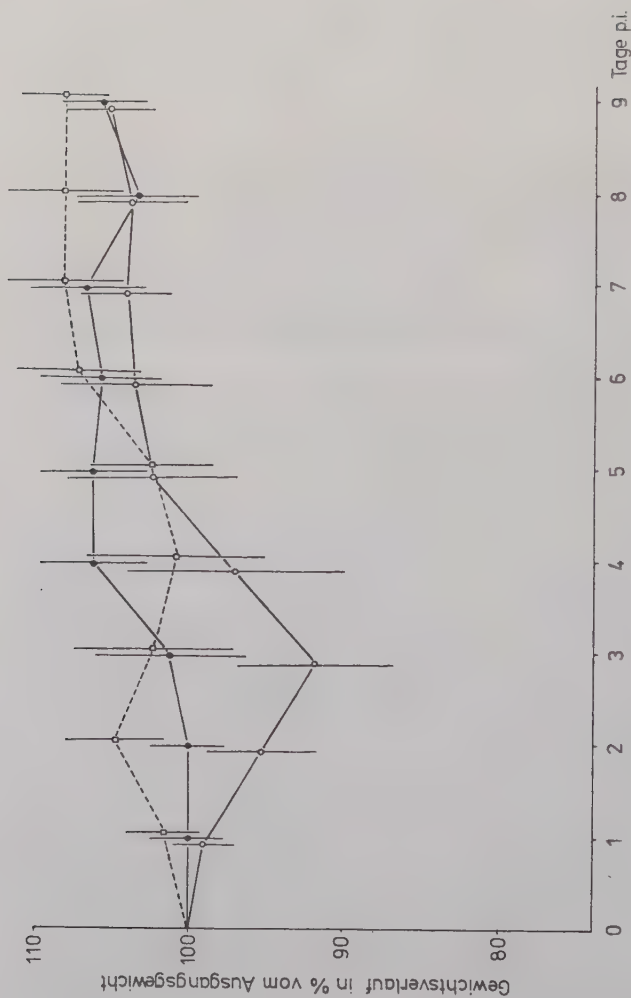


Abb. 8: Gewichtsverlauf nach 3 x 7 mg MTX/kg (●) und 3 x 12 mg MTX/kg (○) im Abstand von jeweils 24 Stunden. --- Kontrolle unbehandelt.

3.2.4 Untersuchung über die Wirkung von MTX bei fünffacher Fraktionierung

In den nachfolgenden Tests wurde MTX immer in 5 Fraktionen mit einem Zeitintervall von drei Stunden zwischen den Injektionen appliziert. Drei Testgruppen, von denen jede 10 Tiere enthielt, wurden mit Dosen von 10, 20 bzw. 30 mg/kg KG je Injektion behandelt. Die Tiere der ersten beiden Gruppen trugen Adenocarcinome, die der dritten Gruppe Fibrosarkome. Eine unerwartet hohe Letalität ergab sich bei der mit 5 x 10 mg MTX/kg KG behandelten Gruppe. 90% der Tiere starben zwischen dem 4. und 6. Tag p.i. Im Vergleich hierzu betrug die Letalität in einem vorher beschriebenen Test (siehe Seite 21) bei gleicher Dosis, Fraktionierung und Protrahierung nur 16%.

100% Letalität hatten die beiden Gruppen, die 5 x 20 bzw. 5 x 30 mg MTX/kg KG injiziert bekommen hatten. Die Tiere starben zwischen dem 3. und 6. Tag p.i.

3.3.1 Untersuchung der Wirkung fraktionierter MTX-Gaben mit anschließender Leucovorin-Gabe

Die Verminderung der Toxizität von MTX durch eine nachfolgende Anwendung von Leucovorin wurde zunächst in einer Versuchsreihe mit 9 Gruppen getestet. Leucovorin wurde dabei in drei verschiedenen Dosen, sowie zu unterschiedlichen Zeitpunkten verabreicht. In jeder der 9 Versuchsgruppen befanden sich 6 Mäuse. Allen Tieren wurden 2 x 100 mg MTX/kg KG im Abstand von 14 Stunden gespritzt. Wie aus früheren Versuchen zu ersehen ist, würde damit eine Letalität von 100% erreicht.

Leucovorin wurde in drei Dosen verwendet:

- a) äquivalent der MTX-Dosis (LCV 100 mg/kg)
- b) 10% der MTX-Dosis (LCV 10 mg/kg)
- c) 1% der MTX-Dosis (LCV 1 mg/kg)

Die 9 Versuchsgruppen wurden in 3 Hauptgruppen mit je 3 Untergruppen eingeteilt. Die Dosisverteilung von Leuco-

vorin entsprach für die 3 Untergruppen einer Hauptgruppe dem auf Seite 28 beschriebenen Schema.

Die erste Hauptgruppe erhielt Leucovorin 2 Stunden nach der ersten MTX-Gabe. 2 Stunden nach der zweiten MTX-Injektion bekam die zweite Hauptgruppe Leucovorin. Der dritten Hauptgruppe wurde Leucovorin sowohl 2 Stunden nach der ersten, sowie 2 Stunden nach der zweiten MTX-Gabe verabreicht.

Alle Tiere wurden zu Beginn der Behandlung, sowie weiter im Abstand von 24 Stunden gewogen.

Letalität: Die einmalige Gabe von Leucovorin 2 Stunden nach der ersten MTX-Injektion zeigte, unabhängig von den applizierten Dosen, keinen positiven Einfluß auf die letale MTX-Wirkung (siehe Tab. 8 und Abb. 9). Alle Tiere dieser Versuchsgruppen verstarben unter der gleichen Symptomatik, wie die Tiere, die nur MTX in dieser Dosierung und in diesem Zeitintervall injiziert bekommen hatten.

Ebenso wirkungslos war die Leucovorin-Dosis, die einem Hundertstel der MTX-Dosis entsprach. Es war dabei bedeutungslos, ob Leucovorin nach der ersten, oder nach der zweiten oder sogar nach beiden MTX-Gaben verabreicht wurde. Keines der so behandelten Tiere überlebte (Vgl. Tab. 8).

Einen, wenn auch geringen Effekt, zeigte die Leucovorin-injektion 2 Stunden nach der zweiten MTX-Gabe bei einer Dosierung von Leucovorin, die gleich der MTX-Dosis oder ein Zehntel der Dosis war. Jeweils eines von 6 Tieren überlebte in diesen beiden Gruppen, was einer Letalität von 83,3% entspricht (siehe Abb. 10 und Tab. 8).

Die beste Wirkung von Leucovorin wurde bei zweimaliger Injektion jeweils 2 Stunden nach der MTX-Gabe erreicht. Die Leucovorin-Dosen mußten dabei entweder äquivalent der MTX-Dosis oder ein Zehntel der MTX-Menge sein. In beiden so behandelten Gruppen überlebten alle Versuchstiere (Tab. 8).

Diejenigen Versuchstiere, die diese Testreihe nicht überlebten, starben wie Abb. 9 und 10 zeigen zwischen dem 3. und 5. Tag p.i.

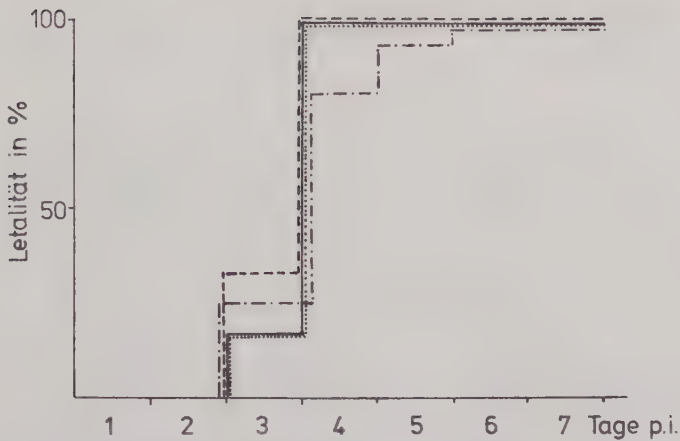


Abb. 9: Zeitliche Absterberate (kumulativ) nach 2 x 100 mg MTX/kg und LCV 2 Stunden nach der ersten MTX-Gabe. — 100 mg/kg LCV, ---- 10 mg/kg LCV, 1 mg/kg LCV, -.-.-.- Kontrolle ohne LCV.

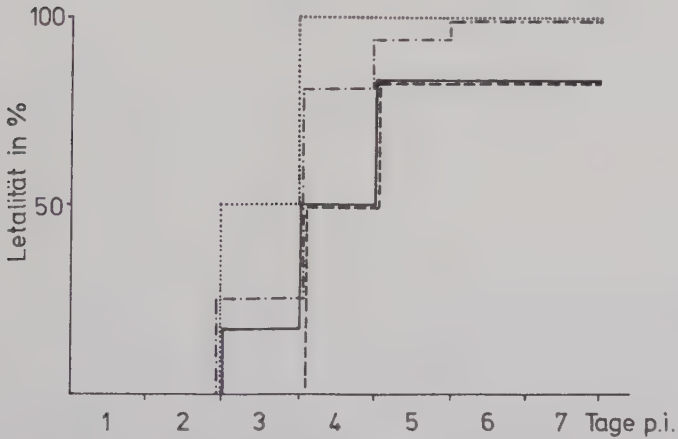


Abb. 10: Zeitliche Absterberate (kumulativ) nach 2 x 100 mg MTX/kg und LCV 2 Stunden nach der zweiten MTX-Gabe. — 100 mg/kg LCV, ---- 10 mg/kg LCV, 1 mg/kg LCV, -.-.-.- Kontrolle ohne LCV.

Tab. 8: Letalität von MTX bei nachfolgender Leucovorin

Gabe MTX-Dosis: 2 x 100 mg/kg KG;

Intervall 14 Stunden

Leucovorin- Dosis	Leucovorin 2 h nach 1.MTX-Gabe	Leucovorin 2 h nach 2.MTX-Gabe	Leucovorin 2 h nach 1.u.2. MTX-Gabe
äquivalent MTX	100% (6/6)	83,3% (5/6)	00,0%
1/10 MTX	100% (6/6)	83,3% (5/6)	00,0%
1/100 MTX	100% (6/6)	100,0% (6/6)	100,0% (6/6)

Gewichtsverlauf: Der durchschnittliche Gewichtsverlauf der einzelnen Versuchsgruppen in Prozent vom Ausgangsgewicht ist den Abb. 11 bis 13 zu entnehmen. Die Höhe der Letalitätsrate in den Versuchsgruppen (Tab.8) spiegelt sich in der Stärke der Gewichtsabnahme wieder.

Bei den Gruppen, die Leucovorin unabhängig von der Dosis einmal nach der ersten bzw. nach der zweiten MTX-Gabe erhielten, sowie bei der Gruppe, die zweimal ein Hundertstel der MTX-Dosis bekam, ging der Gewichtsverlauf nach einer leichten Schulterung oder einem geringen Anstieg am ersten Tag p.i. in einen linearen Gewichtsverlust über. Am dritten Tag p.i. erreichten diese Gruppen den kritischen Bereich von 77% des Ausgangsgewichtes. Dieser Wert repräsentiert das durchschnittliche Todesgewicht der Tiere nach letaler Applikation von MTX. Am gleichen Tag waren auch die ersten Todesfälle zu registrieren (siehe Abb. 11, 12, 13). Nicht in diesen letalen Bereich des Gewichtsverlustes kamen die beiden Gruppen, die zweimal Leucovorin in einer Dosierung bekommen hatten, die gleich der MTX-Dosis war bzw. ein Zehntel dieser Dosis betrug. Den höchsten Gewichtsverlust erreichten diese beiden Gruppen, wie auch die anderen, am 3. Tag p.i. Anschließend begann eine Erholungsphase von 3 bis 5 Tagen, an deren Ende das ursprüngliche Gewicht wieder erreicht war. Überraschenderweise hatte die Gruppe mit 2-maliger äquivalenter LCV Dosierung eine stärkere Gewichtsabnahme und eine längere Reconvaleszenzphase als die Gruppe mit $2 \times 1/10$ LCV (siehe Abb. 13).

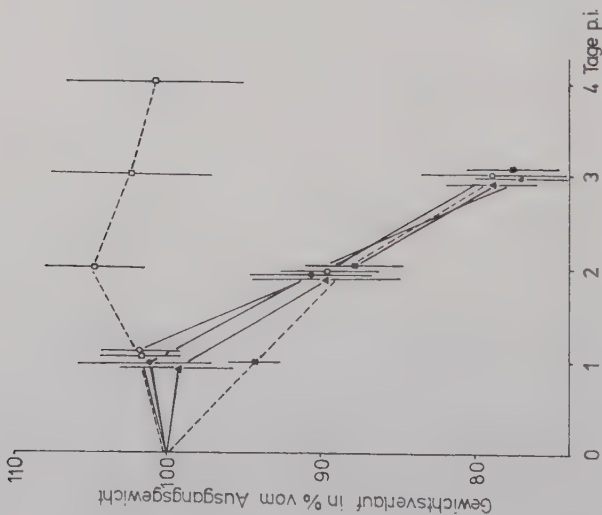


Abb. 11: Gewichtsverlauf nach 2 x 100 mg MTX/kg - 14 Std. und LCV 2 Std. nach der ersten MTX-Gabe.
 ● LCV 100 mg/kg, ○ LCV 10 mg/kg, ▲ LCV 1 mg/kg, ■ Kontrolle ohne LCV, □ Kontrolle unbehandelt.

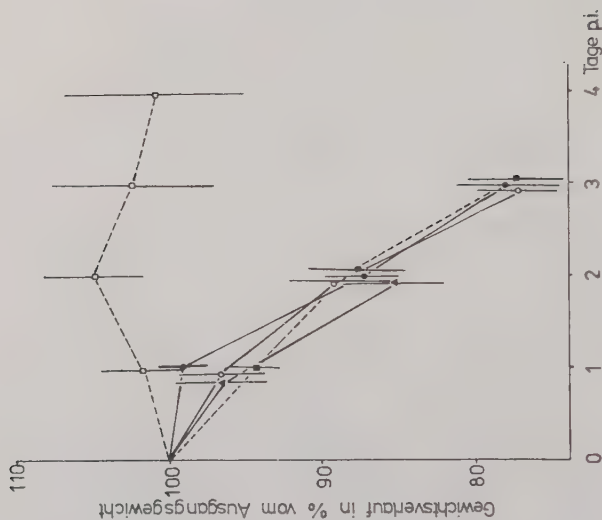


Abb. 12: Gewichtsverlauf nach 2 x 100 mg MTX/kg - 14 Std. und LCV 2 Std. nach der zweiten MTX-Gabe.
 ● LCV 100 mg/kg, ○ LCV 10 mg/kg, ▲ LCV 1 mg/kg, ■ Kontrolle ohne LCV, □ Kontrolle unbehandelt.

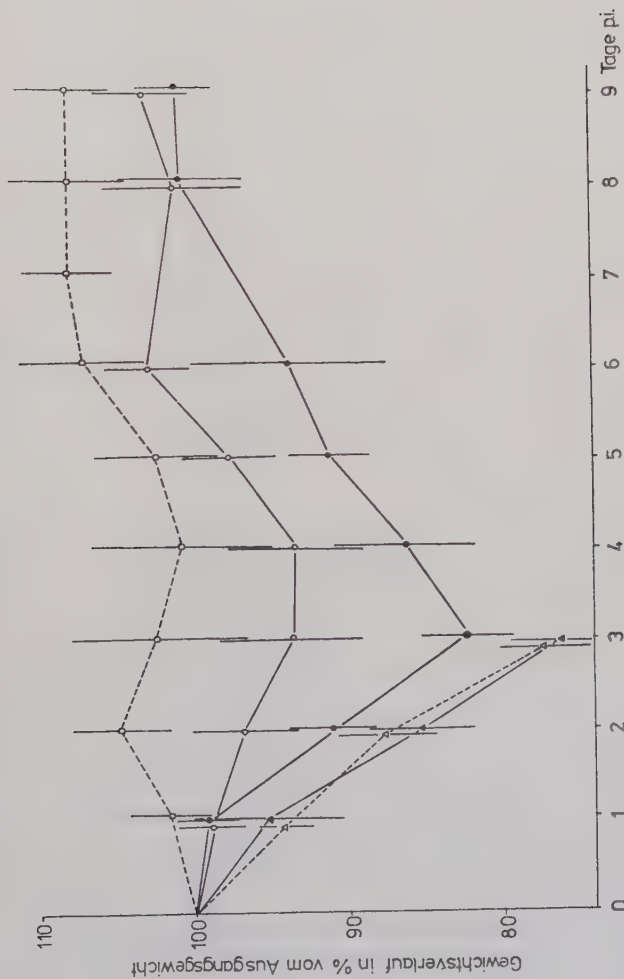


Abb. 13: Gewichtsverlauf nach 2 x 100 mg MTX/kg - 14 Std. und LCV 2 Std. nach der ersten und nach der zweiten MTX-Gabe.
 ● 2 x 100 mg LCV/kg, ○ 2 x 10 mg LCV/kg, ▲ 2 x 1 mg LCV/kg, □ Kontrolle ohne LCV, □ Kontrolle unbehandelt.

3.3.2 Testung der Wirkung von Leucovorin bei zeitlich differenter Gabe nach MTX

Auch bei diesen Versuchen wurden, wie schon in den vorigen Tests, allen Tieren die tödliche MTX-Dosis von $2 \times 100 \text{ mg/kg KG}$ im Zeitabstand von 14 Stunden verabreicht. Sowohl nach der ersten wie nach der zweiten MTX-Injektion erhielt jede Maus eine Leucovorininjektion von jeweils einem Zehntel der MTX-Menge (10 mg/kg KG). Die Intervalle zwischen der MTX-Applikation und der Leucovorin-Gabe waren je nach Versuchsgruppe unterschiedlich. Sie variierten zwischen 1 und 12 Stunden. Behandelt wurden 7 Gruppen mit je 6 Versuchstieren. Ferner wurden die Ergebnisse der Versuchsgruppe verwendet, die in der vorigen Versuchsreihe unter den selben Bedingungen beidemal Leucovorin im Abstand von 2 Stunden nach MTX erhielt. Die Zeitintervalle zwischen der MTX- und der Leucovorin-Gabe betrugen in den anderen Gruppen 1, 4, 6, 8, 10 und 12 Stunden. Im Intervall von 6 Stunden wurden 2 Gruppen behandelt.

Alle Versuchstiere dieser 8 Gruppen überlebten die MTX-Behandlung, obwohl die anschließende Leucovorin-Therapie im zeitlichen Intervall sehr differierte.

Die Gewichtsverluste zeigten im allgemeinen keine wesentlichen Abweichungen (siehe Abb. 14). Mit einem Gewichtsverlust auf 87,5% vom Ausgangsgewicht erreichte die Gruppe, die Leucovorin 4 Stunden nach MTX bekommen hatte, am 4. Tag p.i. den tiefsten Wert von allen Gruppen. Diejenigen Gruppen, die Leucovorin zwischen 1 und 6 Stunden nach MTX erhielten, hatten ihr Gewichtsminimum zwischen dem 3. und 4. Tag p.i.

Dagegen hatten die Gruppen mit einem größeren Zeitabstand zwischen der MTX- und Leucovorin-Applikation (6 - 12 Stunden) ihren maximalen Gewichtsverlust bereits am 1. Tag p.i. (siehe Tab. 9).

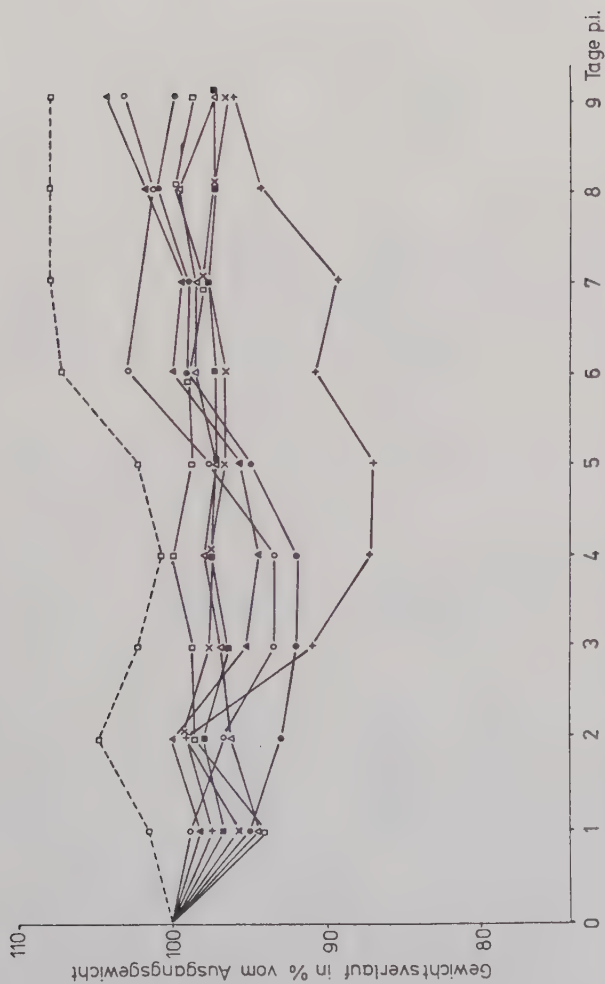


Abb. 14: Gewichtsverlauf nach 2 x 100 mg MTX/kg - 14 Std. und jeweils 10 mg LCV/kg nach der ersten und nach der zweiten MTX-Gabe. Zeitabstand zwischen den MTX und LCV Injektionen: ● 1 Std., ○ 2 Std., + 4 Std., ▲ 6 Std., △ 8 Std., ■ 10 Std., x 12 Std., □ Kon-
trolle unbehandelt.

Tab. 9: Gewichtsverlauf nach 2-maliger Gabe von
MTX und LCV mit unterschiedlichem Zeit-
abstand zwischen den MTX und LCV-Applikationen

Abstand zw. MTX u. Leucov. Applikation (Std.)	niedr. Gew. während der Behandlung (% v. Aus- gangsgewicht)	s	Tag des min. Gewichts p.i.
1	91,9%	± 7,6%	4
2	93,8%	± 9,8%	3+4
4	87,5%	± 9,1%	4+5
6/I	94,0%	± 8,4%	4
6/II	94,6%	± 7,5%	1
8	96,7%	± 3,3%	1+3
10	94,3%	± 3,5%	1
12	95,7%	± 6,4%	1

s = Standardabweichung

1.3.3 Testung der MTX-Wirkung mit nachfolgender Leucovorin-Gabe bei wiederholter Anwendung

Geprüft wurde in dieser Testserie wie sich eine mehrmals wiederholte Applikation von MTX mit nachfolgender Leucovorin-Gabe auf die Tiere auswirkt.

Die Versuchsreihe bestand aus 5 Gruppen mit jeweils 6 Versuchstieren, die alle ein Fibrosarkom hatten. Die verabreichte MTX-Menge betrug 100 mg/kg KG je Injektion. 6 Stunden nach jeder Gabe von MTX wurde den Tieren eine Dosis von 10 mg/kg KG Leucovorin injiziert. Weitere derartige Behandlungen folgten dann immer 24 Stunden nach der vorausgegangenen MTX-Applikation. Die einzelnen Gruppen wurden unterschiedlich oft nach diesem Schema behandelt. Genaue Angaben über die Behandlungen sind der Tab. 10 zu entnehmen.

Tab. 10: Letalität nach mehrfachen Behandlungen mit MTX und LCV

Gruppe	Zahl d. Behandlungen	Gesamtdosis: MTX / Leucov. (mg/kg)		Letalität absolut / %	
1	1	100	10	0	00,0
2	2	200	20	0	00,0
3	3	300	30	1	16,6
4	4	400	40	2	33,3
5	5	500	50	5	83,3

Letalität: Mit der Anzahl der Behandlungen stieg bei diesem Versuch auch die Letalität. Keine Tiere starben, wie nach den Ergebnissen früherer Versuche erwartet werden konnte, in den beiden Gruppen, die ein- oder zweimal behandelt wurden. Die Todesfälle in den übrigen Gruppen traten mit einer Ausnahme alle erst nach dem fünften Tag (nach der ersten Injektion) auf (siehe Abb. 15). 1 Tier starb nach 3-maliger Gabe, nach 4-maliger Applikation starben 2 und nach 5-maliger Gabe 5 Tiere.

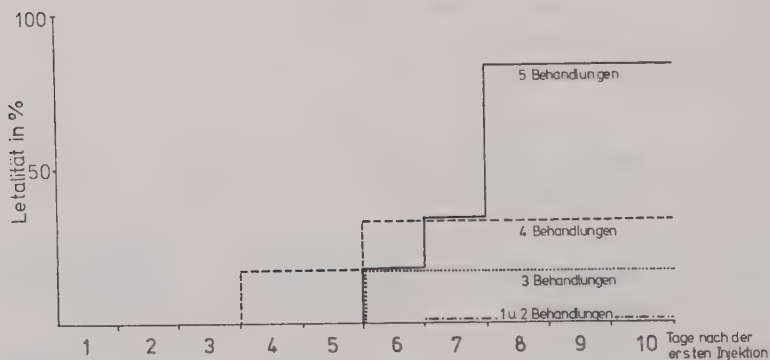


Abb. 15: Absterberate (kumulativ) nach mehrmaligen Behandlungen mit 100 mg MTX/kg und nachfolgend im Abstand von 6 Stunden 10 mg LCV/kg. Die Behandlungen erfolgten immer im Abstand von 24 Stunden.

Gewichtsverlauf: Bei der ersten Gruppe machte sich die Behandlung im Gewichtsverlauf überhaupt nicht bemerkbar. Das durchschnittliche Gewicht dieser Gruppe stieg bereits am 1. Tag p.i. an und blieb auch während der gesamten weiteren Behandlungszeit über dem Ausgangswert. Nach einem leichten Gewichtsanstieg auf 101,5% am ersten Tag p.i. erfolgte bei der zweiten Gruppe ein Gewichtseinbruch, der am dritten Tag (nach d. 1. Injektion) sein Minimum mit 96,5% erreichte. Am vierten Tag war bereits eine deutliche Erholung sichtbar.

Die Gewichtsabnahme der 3. und 4. Gruppe verlief beinahe gleich. Nach dem 2. Tag trat ein rascher Gewichts-schwund auf, der am 4. Tag mit 85% vom Ausgangsgewicht seinen tiefsten Punkt erreichte. Erst nach dem 5. Tag setzte eine Rekonvaleszenzphase ein.

Ebenso wie die meisten anderen Gruppen verzeichnete die 5. Gruppe am ersten Tag einen leichten Gewichtszuwachs. Nachdem sie am 2. Tag das Ausgangsgewicht wieder erlangt hatte, folgte eine lineare Gewichtsabnahme. Am 7. Tag kam sie schließlich mit 80,5% von Ausgangsgewicht in den letalen Grenzbereich (siehe Abb. 16).

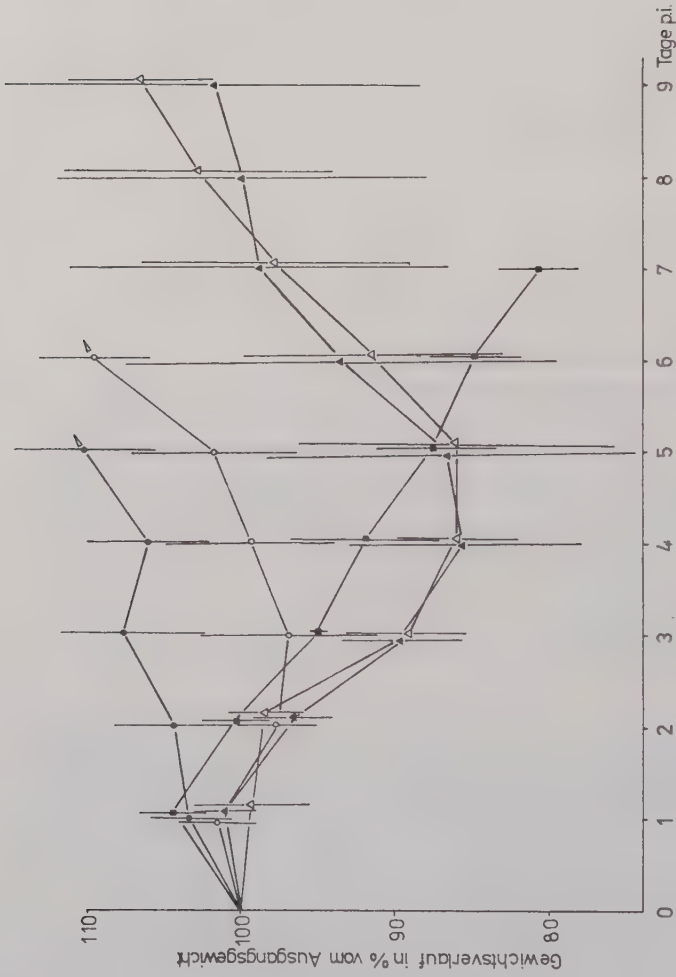


Abb. 16: Gewichtsverlauf nach mehrmaligen Behandlungen mit 100 mg MTX/kg und nachfolgend im Abstand von 6 Stunden 10 mg LCV/kg. Der Zeitabstand zwischen den MTX-Gaben betrug jeweils 24 Stunden.
Anzahl der Behandlungen: ● 1 x, ○ 2 x, × 3 x, ▲ 4 x, □ 5 x.

3.4 Bestimmung der MTX-Toxizität nach fraktionierter Gabe mit nachfolgender Knochenmarkstransplantation

Es wurde mit dieser Versuchsreihe getestet, inwieweit die tödliche Wirkung von MTX durch eine Knochenmarkstransplantation vermindert werden könnte.

Um Vergleichswerte mit Tieren ohne Knochenmarkstransplantation zu erhalten, wurden zwei Gruppen nach dem Fraktionierungsschema und den Dosen des auf Seite 25 beschriebenen Tests behandelt. Eine Gruppe, von denen jede aus 10 Tieren bestand, bekam 5 x 10 mg/kg, die andere 5 x 20 mg/kg Methotrexat gespritzt. Auch der zeitliche Abstand zwischen zwei Injektionen war wieder 3 Stunden. 24 Stunden nach der letzten MTX-Gabe wurde dann den Mäusen das Knochenmark unbehandelte gesunder Tiere übertragen.

Trotz der Knochenmarkstransplantation starben wiederum alle Tiere, die mit 5 x 20 mg MTX/kg KG behandelt worden waren zwischen dem 3. und 5. Tag p.i. Somit bestand kein Unterschied in der Letalität zu den Tieren, die die gleiche Behandlung aber ohne Knochenmarkstransplantation erhielten.

Dagegen überlebten alle Tiere, denen 5 x 10 mg/kg KG gespritzt und das Knochenmark übertragen wurde.

In einem weiteren Test wurden nochmals 20 Tiere nach dem schon bekannten Schema mit 5 x 10 mg MTX/kg KG behandelt. 10 Tiere wurden wieder nach 24 Stunden einer Knochenmarkstransplantation unterzogen; die restlichen 10 Tiere dienten als Kontrolle.

Kein Tier starb diesmal in der Kontrollgruppe. In der Gruppe mit Knochenmarkstransplantation war am vierten Tag nach der MTX-Injektion der Tod eines Tieres zu verzeichnen.

Tab. 11: Applikation von MTX in 5 Fraktionen mit dreistündigem Intervall zwischen den Injektionen

Fraktions- dosis (mg/kg KG)	Knochen- marks- transpl.	Zahl d. Tiere	Zahl d. Tiere mit Tumoren	Letalität absolut	Letalität i. Prozent
10	-	6	-	1	16,6
10	-	10	10 Adc.	9	90,0
10	+	10	-	0	00,0
10	-	10	10 Fs.	0	00,0
10	+	10	10 Fs.	1	10,0
20	-	10	10 Adc.	10	100,0
20	+	10	-	10	100,0
30	-	10	10 Fs.	10	100,0

3.5 Histologische Untersuchung der MTX-Schäden am Darm nach Gabe einer letalen MTX-Dosis

Die histologischen Darmpräparate, die am 5. Tag nach der Injektion einer tödlichen MTX-Dosis (5 x 20 mg/kg KG - 12 Std.) hergestellt worden waren, zeigten alle ein ziemlich einheitliches Bild. Im Dünndarm waren deutliche durch das Zytostatikum verursachte Schäden zu erkennen. Allerdings waren diese Schädigungen nur mehr an der Übergangszone der Krypten zu den Zotten und an den Zotten selbst nachzuweisen, während das Epithel in den unteren Teilen der Krypten völlig regeneriert und intakt war. Es konnten in diesen Bereichen morphologisch keinerlei durch das Zytostatikum verursachte Veränderungen festgestellt werden. Der Epithelsaum aus hochprismatischen Zellen war ununterbrochen, die Zellen waren regelmäßig angeordnet, Zell- und Kerngröße entsprachen der Norm. Vereinzelt konnten Mitosen beobachtet werden.

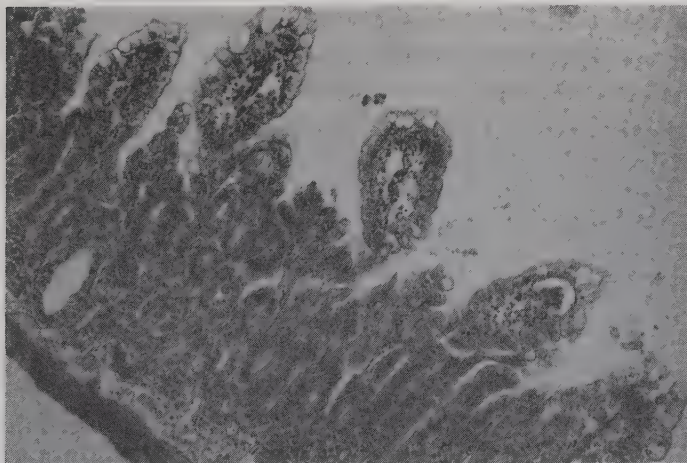


Abb. 17 Dünndarm: Zustand nach 5 x 20 mg MTX/kg KG -
12 Std. 5. Tag p.i. Vergrößerung 250 x

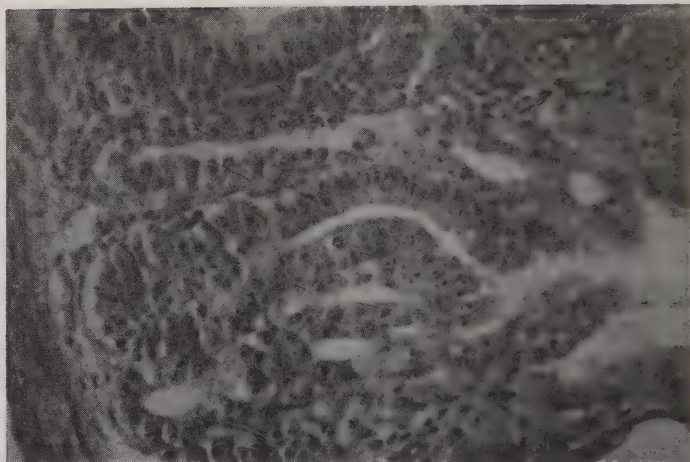


Abb. 18: Das am 5. Tag p.i. wieder völlig intakte Epithel der Krypten. Vergrößerung 400 x

Auf Grund der Regeneration in den Krypten und der Zellmigration waren die Schädigungen im unteren Anteil der Zotten und in der Übergangszone zu den Krypten am geringsten. Zur Zottenspitze hin nahmen die morphologischen Veränderungen in den Zellen zu. In den unteren Bereichen der Zotten waren nur vereinzelt kleinere zystische Strukturen im Kern und Zytoplasma zu erkennen. Größe und Form der Zellen und Zellkerne entsprachen aber noch der Norm. Weiter distal kam es dann bei allen Zellen zu einer Zunahme des Zellvolumens und zu einer Vergrößerung des Zellkerns mit Zeichen der Karyolyse. Im apikalen Zottenbereich bestand der Epithelsaum, soweit er nicht abgeschilfert war, nur noch aus Resten abgestorbener Zellen. Diese polymorphen zystisch aufgetriebenen Zellreste waren nicht anfärbbar. Zellinhalte wie Kern oder Zytoplasma waren nicht mehr zu erkennen. Insgesamt erschienen die Zotten verplumpt und verkürzt.

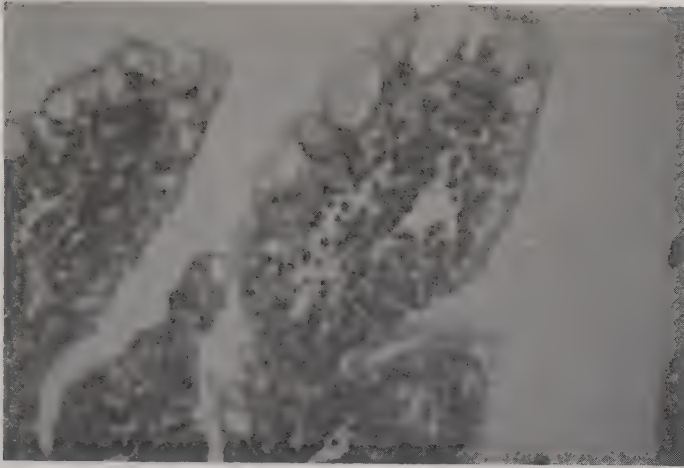


Abb. 19: Ausschnitt aus Abb. 17 Dünndarmzotten
Vergrößerung 400 x

Im Kolon hingegen konnten keinerlei morphologische Schäden festgestellt werden. Die Krypten waren regelmäßig nebeneinander angeordnet und völlig intakt. Sie waren mit einem ununterbrochenen Epithelsaum ausgekleidet, der, dem Kolon entsprechend, reichlich mit Becherzellen versehen war.



Abb. 20 Kolon: Zustand nach 5 x 20 mg MTX/kg KG - 12 Std.
5. Tag p.i. Vergrößerung 400 x

4. Diskussion

4.1.1 Struktur und Hemmungsmechanismus von Methotrexat

Als Folsäureantagonist gehört Methotrexat in die Reihe der Antimetabolite. Es hemmt, da es sterisch der Folsäure sehr ähnlich ist, spezifisch die Dihydrofolsäure-Reductase (2, 27). MTX (Methotrexat) unterscheidet sich in seiner chemischen Struktur von der Folsäure durch den Austausch der -OH- Gruppe mit einer Aminogruppe in Stellung 4, sowie der Einführung einer Methylgruppe in Stellung 10.

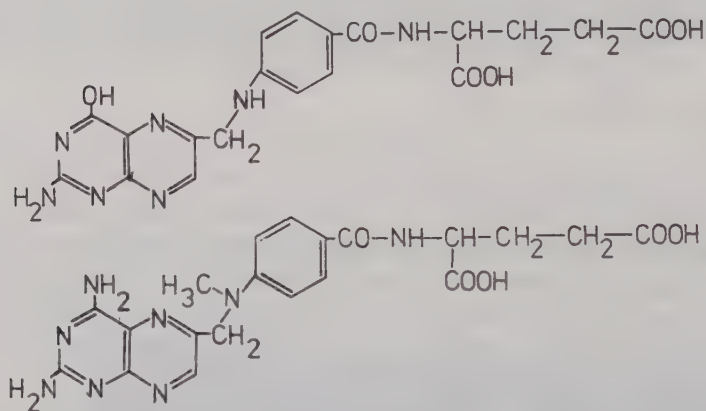


Abb. 21: Chemische Strukturformel der Folsäure (oben) und von Methotrexat (unten).

Die Enzymhemmung beruht auf einer sehr starken, jedoch kompetitiven Bindung an das Enzymprotein. Die Bindungsaffinität von MTX ist bei einem pH von 7,5 um 20 000 - mal größer als die Affinität der Dihydrofolsäure zum Enzym (27). Durch die Hemmung der Dihydrofolsäure - Reductase (DHFR) ist der Hauptweg zur Bildung von Tetrahydrofolsäure aus Dihydrofolsäure sowie der weiteren Folgeprodukte unterbrochen. Für eine Reihe biologischer Vorgänge in der Zelle steht somit zuwenig Tetrahydrofolsäure zur Verfügung.

So werden die DNA-, RNA- und Proteinsynthese durch den Produktmangel beeinflusst. Dabei wirkt sich für die Zelle am meisten aus, daß sie das für die DNA-Synthese notwendige Thymidin-Mono-Phosphat nicht aus Uridin-Mono-Phosphat synthetisieren kann (2). Während die DNA-Synthese durch den Thymidinmangel zum Erliegen kommt, geht die RNA- und Proteinsynthese, wenn auch gehemmt, weiter (2). Dieses unausgeglichene Zellwachstum (unbalanced growth) erklärt die Zytotoxizität von MTX (19, 30). Genaue Ursachen, die letztlich zum Zelltod führen, sind aber bisher noch nicht bekannt (2).

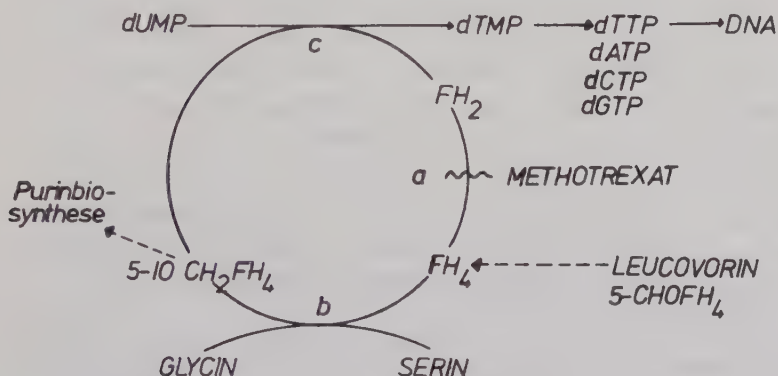


Abb. 22: Hemmung der DHFR durch MTX

- a: Dihydrofolsäurereductase
- b: Serintranshydroxymethylase
- c: Thymidylatsynthetase

Da im wesentlichen die DNA-Synthese durch MTX gehemmt wird, werden diejenigen Zellen, die sich während der Einwirkung des Medikaments gerade in der S-Phase befinden, am meisten geschädigt bzw. getötet (2). Besonders stark ist die tödliche Wirkung des Antimetaboliten bei rasch proliferierenden Zellgruppen. Dies beruht darauf, daß durch die höhere Zellumsatzrate auch eine größere Fraktion der Gesamtzellpopulation während

der Zeit der Medikamentenwirkung die sensitive Phase des Zellzyklus durchläuft (14). Hingegen ist MTX gegen Zellpopulationen in der Ruhephase (Plateau-Zellen) relativ unwirksam (2). Dieser auf der Proliferationskinetik von Geweben basierende Wirkmechanismus von Antimetaboliten wird in der Tumorthherapie genutzt.

4.1.2 Pharmakologisches Verhalten von MTX

4.1.2.1 Applikation:

Orale therapeutische Dosen von MTX bis zu einer Menge von 10 mg/kg KG werden durch den Gastrointestinaltrakt sehr rasch und vollständig aufgenommen. Sehr hohe Dosen werden hingegen weniger gut resorbiert, ebenso ist die Resorptionszeit verlängert (2). Bei einzelnen Patienten werden auch individuell verschiedene Resorptionsgeschwindigkeiten und damit auch ein geringerer Anstieg des Serumwirkspiegels beobachtet (10).

Für eine gezielte Therapie von Tumoren, bei der relativ hohe und konstante Blutspiegel erreicht werden müssen, ist daher die parenterale Applikation besser geeignet. MTX wird hierbei entweder intravenös gespritzt oder in einer Infusion verabreicht.

Ferner kann MTX intramuskulär, intraarteriell oder intrathekal appliziert werden.

4.1.2.2 Transportmechanismus:

Da MTX ein großes polares fettunlösliches Molekül ist, benötigt es zum Passieren der Zellmembran ein spezifisches Transportsystem. Hierbei verwendet MTX den aktiven Transportmechanismus, der auch von der reduzierten Form der Folsäure (Leucovorin) benutzt wird. (2). Das Eindringen von MTX in Zellen - sowohl in gesunde wie neoplastische - wie auch die Organverteilung

sind bei normaler Dosierung von der Anwesenheit dieses Transportsystems abhängig. So wird MTX in der Leber, Niere und in der Darmschleimhaut sehr gut aufgenommen, im Muskel- und Fettgewebe und im Gehirn sind dagegen nur geringe Konzentrationen zu finden (2).

Bei primärer Resistenz der Tumorzellen verwendet man jedoch sehr hohe Dosen von MTX um unabhängig von dem (bei diesen Zellen gestörten oder nicht vorhandenen?) aktiven Transportsystem durch passivem Transport genügend hohe MTX-Konzentrationen zu erreichen (21, 8).

4.1.2.3 Serumspiegel von MTX beim Menschen

Nach intravenöser Applikation verteilt sich MTX in kurzer Zeit in einem Volumen, das etwa 74% des Körpergewichts ausmacht. Diese Verteilung entspricht weitgehend dem Volumen der Gesamtkörperflüssigkeit. (13).

Aus dem Serum verschwindet MTX nach i.v. Gabe in drei Phasen. In der Initialphase, die der Verteilung in der Körperflüssigkeit entspricht, hat MTX für kurze Zeit eine Halbwertszeit von $0,75 \pm 0,11$ Stunden. Die zweite anschließende Phase ist die Phase der renalen Ausscheidung. Die hierfür angegebenen Halbwertszeiten differieren zwischen 2 und 3,5 Stunden. Das Einsetzen der terminalen Phase ist abhängig von der Serumkonzentration von MTX. Sie beginnt erst bei Serumspiegeln von 10^{-7} mol, die bei konventionellen Dosen zwischen 6 und 12 Stunden p.i., bei hohen Dosen zwischen 30 und 48 Stunden p.i. erreicht werden. Die Halbwertszeit dieser Phase beträgt $10,4 \pm 1,8$ Stunden. Diese terminale Phase könnte durch den enterohepatischen Kreislauf von MTX bedingt sein (3).

Etwa 50 - 70% von MTX werden im Serum an Protein, hauptsächlich an Albumin gebunden. Hingegen ist die Proteinbindung im interstitiellen Raum relativ gering und beträgt zwischen 0 und 17%. Veränderungen in der Serumproteinbindung bewirken einen Anstieg des freien MTX im extrazellulären Raum, wodurch wiederum der

Einstrom in die Zelle verändert wird. Ferner wird durch eine veränderte Serumproteinbindung auch die renale Ausscheidung verändert (3).

Nur in sehr geringem Maß wird wegen der Lipidunlöslichkeit von MTX bei physiologischem pH die Blut-Hirn-Schranke überwunden. So beträgt bei systemischer Anwendung der Quotient Liquor/Serum 0,02 bis 0,05 (3). Um daher wirksame Spiegel im Liquor für die Behandlung von Tumoren des ZNS zu erreichen, ist die intrathecale Applikation notwendig.

4.1.2.4 Serumspiegel von MTX bei der Maus

Untersuchungen von Borsa et. al. (4) über den zeitlichen Verlauf des Serumspiegels von MTX bei Mäusen haben ergeben, daß MTX in zwei verschiedenen Phasen aus dem Serum verschwindet. Bei Dosen zwischen 5 mg/kg KG und 500 mg/kg KG, die intraperitoneal injiziert wurden, zeigte sich, daß während der ersten 4 Stunden MTX mit einer Halbwertszeit von 31 ± 4 Minuten aus dem Serum ausgeschieden wurde. In der nachfolgenden zweiten Phase betrug dann die Halbwertszeit 12 ± 4 Stunden.

4.1.2.5 Ausscheidung und Metabolismus beim Menschen

Sowohl nach oraler, als auch nach parenteraler Anwendung von MTX wird der größte Teil des Medikaments (54 - 88% der applizierten Dosis) während der ersten 24 Stunden unverändert über die Nieren ausgeschieden. (13). Etwa 41% der applizierten Dosis werden bereits während der ersten sechs Stunden ausgeschieden. Ca. 95% der Dosis haben nach 30 Stunden den Körper über die Nieren verlassen (3). Nur ein geringer Teil (2 - 6%) wird beim Menschen biliär über den Darm abgegeben (2).

Bei der renalen Ausscheidung wird MTX sowohl glomerulär filtriert, als auch tubulär sezerniert. Da p-Aminohippurate und Salizylate das selbe tubuläre System für die Exkretion verwenden, kommt es bei gleichzeitiger

Anwendung dieser Stoffe zur gegenseitigen Behinderung bei der Ausscheidung (2, 3).

Der initial hohe Anteil an renal ausgeschiedenem MTX repräsentiert den Teil des Medikaments, der im Gewebe nicht an DHFR gebunden wurde. Die folgende geringe Ausscheidung von 1 - 2% der verabreichten Dosis pro Tag entsteht durch die langsame Freisetzung von MTX aus dem Gewebe (2).

Die anfängliche Meinung MTX würde beim Menschen im Gegensatz zum Kaninchen - das über Leberenzyme zur Inaktivierung von MTX verfügt (6) - nicht metabolisiert, hatte sich nicht bestätigt. Zwar wird MTX beim Menschen quantitativ nicht signifikant abgebaut, es konnten aber inzwischen im Urin, im Plasma und in der Leber Metabolite nachgewiesen werden. Bertino (2) und Bleyer (3) verwiesen auf Arbeiten von Henderson (13) und Valerino, die zeigen, daß MTX beim Durchlauf des enterohepatischen Kreislauf von den Darmbakterien teilweise abgebaut wird. Ferner konnte im Urin von Patienten, die unter MTX-Behandlung standen, 7-Hydroxymethotrexat als Metabolit gefunden werden. Das zu dieser Biotransformation zugehörige Enzym Aldehydoxidase wurde in der Leber von Bleyer et al. (3) nachgewiesen.

4.1.2.6 Ausscheidung von MTX bei der Maus

Wie der Mensch gehört die Maus zu den Arten, die nicht die Fähigkeit besitzen MTX enzymatisch abzubauen (6). Die Ausscheidung von MTX bei der Maus erfolgt über die Nieren, wobei MTX unverändert den Körper verläßt.

4.1.2.7 Nebenwirkungen von MTX

Nebenwirkungen unter der Behandlung mit zytostatisch wirksamen Antimetaboliten werden - wie unter der Einwirkung anderer Zytostatika - durch die fehlende selektive Wirksamkeit auf die Tumorzellen und somit gleichzeitige Schädigung der gesunden proliferierenden Körperzellen hervorgerufen (28).

Die gefürchtetste Nebenwirkung beim Menschen ist die Knochenmarksschädigung mit Leukopenie, Thrombozytopenie und Reticulozytopenie, die nach hohen Einzeldosen von MTX (1-5 mg MTX/kg KG) am 9. - 10. Tag nach Medikamentengabe ihren Tiefpunkt erreicht. Betroffen sind dabei im Gegensatz zu den reifen Blutzellen alle Elemente des Knochenmarks, die an der Blutbildung beteiligt sind (2). Nach mäßig toxischen MTX-Dosen können 2 - 7 Tage nach Applikation Schädigungen bis hin zu Nekrosen an den rasch proliferierenden Schleimhäuten in Mund, Rachen, Magen und Darm beobachtet werden (2, 28). Als Folge dieser Schleimhautveränderungen treten bei den Patienten meist Erbrechen und Durchfall auf. Gastrointestinale Blutungen und auch Perforationen können noch als Komplikation hinzukommen. Der Grad der jeweiligen Schleimhautschädigung nach MTX ist dabei eine Funktion der MTX-Dosis und der Anwendungsdauer und reicht von leichten Schleimhauterythemen bis zu äußerst gefährlichen Ulcerationen (2).

Toxisch bedingte Leberfibrosen können unter hohen Medikamentendosen sowie bei Langzeittherapie vorkommen (2). Ferner kommen bei Applikation von MTX Haarausfall, Vasculitis und Parästhesien vor (2, 28).

4.1.3 Leucovorin: Wirkungsweise und Anwendungsbereiche

Die aktive Form der Folsäure (Tetrahydrofolsäure = FH_4) dient der Bereitstellung von aktiven Einkohlenstoff (C_1)-Einheiten für die verschiedensten biochemischen Prozesse der Zelle. Da Leucovorin (5-Formyltetrahydrofolsäure) direkt in den Pool der aktiven C_1 -Einheiten eingeht, kann es beim Enzymblock durch MTX als Antidot eingesetzt werden (2, 21, 22). Die Enzymhemmung wird dabei aber nicht aufgehoben. Durch die Gabe von Leucovorin wird die Zelle nun in die Lage versetzt, die hinter dem Enzymblock liegenden Syntheseschritte zumindest solange zu vollziehen, solange ausreichend folinsäure zur Verfügung gestellt wird. Dies ist möglich, da Folsäure-Antagonisten die Überführung von Folsäure in Folinsäure hemmen, die Wirkung der Folinsäure durch diese Antimetabolite aber in keiner Weise beeinflusst wird (2). Diesen Mechanismus nutzt man in der hochdosierten Stoßtherapie mit MTX. Dabei ist es das Ziel, durch hohe MTX-Dosen, die teils schon im letalen Bereich liegen, einen zeitlich begrenzten, beinahe absoluten Folinsäuremangel zu erzeugen, der sich für die rasch proliferierenden neoplastischen Tumorzellen mit ihrem hohen Folinsäurebedarf tödlich auswirkt. Die gesunden Gewebe werden durch die nachfolgende LCV-Gabe (Leucovorin-rescue) vor dem Absterben bewahrt.

Die Gesamtdosierung von LCV als Antidot in der hochdosierten MTX-Stoßtherapie soll etwa 10 - 20% der applizierten MTX-Dosis entsprechen (17).

4.1.4 Interaktionen zwischen MTX und Leucovorin

Da MTX und Leucovorin bei der Aufnahme in die Zelle das gleiche aktive Transportsystem benutzen, kommt es hierbei zu einer gegenseitigen Behinderung. Durch diesen kompetitiven Hemmungsmechanismus ist es möglich, bei entsprechend hoher Dosierung des einen Medikamentes die Aufnahme des anderen in die Zelle weitgehend zu verhindern. Ferner wird durch den Influx des einen Medikamentes der Efflux des anderen aus der Zelle gesteigert. Der Erfolg einer Leucovorin-Gabe nach einer MTX-Behandlung ist also nicht allein das Ergebnis der Umgehung des blockierten Enzymsystems, sondern auch der Hemmung der Aufnahme von Serum-MTX in die Zelle und der Beschleunigung des Effluxes von ungebundenem intrazellulärem MTX (2).

4.2. Diskussion der eigenen Ergebnisse

4.2.1. Abhängigkeit der MTX-Wirkung von der Dosis

Bei den in Einzeldosen applizierten MTX-Mengen konnte bezüglich der Letalität keine Dosiswirkbeziehung erstellt werden, da wie aus Tab. 1 ersichtlich alle Tiere die Versuche überlebten. Als relativ ungenauen Parameter für die Dosiswirkbeziehung kann man in dieser Testreihe nur die klinische Symptomatik verwenden. Erst Dosen oberhalb 100 mg MTX/kg KG zeigten Nebenwirkungen, die mit einer Steigerung der Dosis zunahmen.

Die Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den von Shewell (23) 1976 angegebenen LD_{50} -Werten für weibliche C_3H -Mäuse von $85,1 \pm 4,3$ mg/kg KG und für weibliche C_3H -Mäuse mit Tumor von $48,8 \pm 5,6$ mg/kg KG. Die im eigenen Test applizierten Dosen lagen um das 5-fache, bei Tieren mit Tumoren um das 6-fache über den von Shewell angegebenen LD_{50} -Werten, ohne eine letale Wirkung zu zeigen.

Von Ferguson et al. wurden 1950 LD_{50} -Werte von 94 mg/kg KG bei Mäusen gefunden (17, 19). Dagegen fanden Margolis et al. (19) nach einmaliger Applikation LD_{50} -Werte bei Mäusen von 430 mg/kg KG, die von Philips et al. (20) mit 425 mg/kg KG bestätigt wurden. Die Diskrepanz zu den Angaben von Ferguson führt Margolis auf die Tatsache zurück, daß die MTX-Proben 1950 noch relativ viel Aminopterin enthielten, das nach Untersuchungen von Philips eine 14-mal höhere letale Wirkung besitzt als MTX.

Der Vergleich der klinischen Symptomatik nach den in den Tests verwendeten hohen Einzeldosen und nach fraktionierten letalen Dosen läßt den Schluß zu, daß die hohen Einzeldosen nur wenig unterhalb dem letalen Bereich lagen.

Ursache für die relativ geringe toxische Wirkung von MTX nach einmaliger Applikation könnte das Phänomen der Selbstbegrenzung verbunden mit der raschen renalen Elimination

sein (siehe 4.3.3.) Dies würde bedeuten, daß MTX nach Injektion die gerade in der S-Phase befindlichen Zellen abtötet und gleichzeitig die übrigen proliferierenden Zellen weitgehend hemmt, von der G_1 -Phase des Zellzyklus in die sensitive S-Phase überzugehen. Wegen der raschen Ausscheidung des Medikaments aus dem Serum würde dann die Wirkkonzentration nicht für einen genügend langen Zeitraum aufrecht erhalten werden, um durch den Folsäuremangel irreparable Schäden an den restlichen Zellen zu verursachen. Sicherlich wäre es aber mit einer Dosissteigerung möglich gewesen, für eine genügend lange Zeit wirksame Serumspiegel zu erlangen, um irreparable intestinale Defekte mit letalen Folgen zu erlangen.

4.2.2.1. Abhängigkeit der MTX-Wirkung von der Fraktionierung

Anders als bei Einzeldosen konnte bei fraktionierter Applikation von MTX eine letale Wirkung erzielt werden. Die Gesamtdosen mit letaler Folge lagen zwischen 50 mg/kg KG und maximal 300 mg/kg KG und somit also unterhalb den höchsten Einzeldosen.

Bei den in 3.2.1. beschriebenen Tests konnte mit einer Steigerung der Dosis für die einzelnen Zeitintervalle zwischen den Applikationen eine Erhöhung der Wirkung beobachtet werden. Im Bezug auf das Ergebnis kam dem Fraktionsintervall aber eine weit größere Bedeutung zu als der Dosis. Den größten Effekt erreichte man, wenn zwischen den Injektionen ein Zeitintervall von 12 bzw. 14 Stunden lag. Die Wichtigkeit des Zeitfaktors veranschaulichen folgende Ergebnisse: Bei einer Dosis von $2 \times 25 \text{ mg/kg KG}$ - 12 Std. trat bei 2 von 6 Tieren der Tod ein, während bei einer 4-fach höheren Dosis ($2 \times 100 \text{ mg/kg KG}$) im 6-Stundenintervall kein Tier starb. Um überhaupt einen letalen Effekt zu erzielen, musste im 12 - 14 Stundenintervall eine Mindestdosis überschritten werden, deren Wert zwischen 2×10 und $2 \times 25 \text{ mg/kg KG}$ liegen dürfte.

Entsprechend der Höhe der Dosierung konnte das Intervall zwischen den Gaben mehr oder weniger variiert werden, um noch eine letale Wirkung zu erreichen. Das heißt, daß das Zeitintervall umso mehr vom idealen Zeitpunkt abweichen durfte, je höher die verwendete MTX-Dosis war. Die Beziehung zwischen Dosis, Intervall und Letalität ist in Abb. 1 dargestellt. Es ergibt sich eine Glockenverteilung für die jeweiligen Dosen, deren Basisbreite von der Höhe der Dosis abhängig ist und deren Gipfel im Intervall von 12 bzw. 14 Stunden liegen.

Eine Ausnahme bildet das Ergebnis von $2 \times 100 \text{ mg/kg KG}$

bei 12 Stunden. Aus nicht erkennbaren Gründen war das Testergebnis von 2 voneinander unabhängigen Versuchen jedesmal niedriger als die erzielten Werte bei 10 und 14 Stunden bei gleicher Dosis, sowie von 2 x 30 mg/kg KG bei 12 Stunden.

Bestätigt wurde auch die Bedeutung des Zeitfaktors in den Tests (3.2.2.), in denen MTX in 3 Fraktionen zu je 100 mg/kg KG verabreicht worden war. Wurde diese Dosis in einem Zeitraum von 2 Stunden verabreicht, so starben 7/10 der Tiere. Bei Applikation im Zeitraum von 12 Stunden starben dagegen 10/10 der Tiere.

Keinerlei Unterschied bezüglich der Wirkung war zu erkennen, wenn MTX in konstanter Gesamtdosierung (50 mg/kg KG) und im gleichen Zeitraum von 12 Stunden in zwei oder fünf Fraktionen angewendet wurde (siehe 3.2.2.). Dies wird auch durch den Gewichtsverlauf in beiden Gruppen bestätigt (Abb. 7). Zwar starb nach 5-maliger Injektion nur eine Maus, während bei 2-maliger Gabe 2 Mäuse starben, doch ist dieser Unterschied statistisch nicht signifikant. Zudem starb die 2. Maus als einzige von allen Tests erst am 10. Tag p.i., was auf eine nicht primär durch MTX hervorgerufene Todesursache schließen läßt.

Bei 5-maliger Gabe im Zeitraum von 12 Stunden zeigte sich ebenso wie in den vorherigen Tests eine Dosis-wirkbeziehung (siehe 3.2.4. und Tab. 11). Tiere mit Fibrosarkom sowie Tiere ohne Tumor hatten nur eine geringe Absterberate bei Verwendung von 5 x 10 mg/kg KG. Die doppelte und dreifache Dosis tötete bereits 100% der Tiere.

9/10 der Tiere mit Adenocarcinom starben bereits nach Gabe von 5 x 10 mg MTX/kg KG. Dieser Wert ist signifikant erhöht gegenüber den übrigen Testergebnissen mit gleichem Fraktionierungsschema und gleicher Dosis. Die

Tiere dieser Versuche hatten entweder ein Fibrosarkom oder keinen Tumor.

Möglicherweise hat speziell das Adenocarcinom einen verstärkenden Einfluß auf die Letalität nach MTX, was auch mit den Erkenntnissen von Shewell (23) über C_3H -Mäuse mit spontanem Adenocarcinom der Mamma übereinstimmen würde. Danach würden Mäuse mit dieser Art von Tumor bei einer geringeren MTX-Dosis ad exitum kommen als gesunde Mäuse.

Hinsichtlich der Letalität war kein Unterschied zwischen den Tieren mit Fibrosarkom und Tieren ohne Tumor zu erkennen.

Bei niedrigen fraktionierten Dosen (3×12 mg MTX/kg KG), die über einen Zeitraum von 48 Stunden gegeben wurden, konnten geringe aber kontinuierliche Auswirkungen auf den Gesamtorganismus nachgewiesen werden. Dies wird durch den Gewichtsverlauf in Abb. 8 veranschaulicht. Da die 3-malige Gabe von 7 mg MTX/kg KG im gleichen Zeitraum keinerlei Effekt erkennen ließ, ist anzunehmen, daß der Grenzwert für Schädigungen für dieses Behandlungsschema zwischen 3×7 und 3×12 mg MTX/kg KG liegt.

Während der Organismus bei der niedrigeren Dosis noch in der Lage ist, die Schäden bis zur nächst folgenden Injektion auszugleichen, gelingt bei der höheren Dosis die Regeneration nicht mehr in dem zur Verfügung stehenden Zeitraum. Die Summierung der Einzelschäden spiegelt sich dann im kontinuierlichen Gewichtsverlust. Mit gering wirksamen Dosen wäre es möglich, wenn sie nur über einen genügend langen Zeitraum gegeben werden, größere Schäden am Gesamtorganismus zu verursachen.

Um überhaupt einen letalen Effekt unter der Verwendung von MTX zu erzielen, ist es, wie die Tests zeigen, notwendig, daß das Medikament über einen längeren Zeitraum in wirksamen Konzentrationen vorhanden ist, um eine genügend hohe Zahl an Zellen töten zu können. Da MTX rasch

aus dem Serum ausgeschieden wird, ist ein Erfolg nur nach excessiven Einzeldosen bzw. nach fraktionierter Anwendung gesichert. Die besten Ergebnisse erhält man, wenn das Mittel über eine Zeitspanne von 12 Stunden verabreicht wird.

4.2.2.2. Einfluß von LCV auf die Toxizität fraktionierter MTX-Gaben.

Die Verwendung von LCV ermöglichte es, Tiere vor dem Tod zu bewahren, die eine tödliche MTX-Dosis ($2 \times 100 \text{ mg/kg KG} - 14 \text{ Std.}$) erhalten hatten. Schon eine Dosis, die 10% der MTX-Menge entsprach ($= 2 \times 10 \text{ mg LCV/kg KG}$) reichte dazu aus. Eine niedrigere LCV-Dosierung ($2 \times 1 \text{ mg LCV/kg KG}$) konnte keinen Erfolg herbeiführen. Größte Bedeutung kam der Applikation von LCV nach jeder MTX-Injektion zu. Nur so war es möglich die Tiere zu retten. Der Zeitabstand ($1 - 12 \text{ Std.}$) zwischen der MTX- und LCV-Gabe war dabei ziemlich unbedeutend, wie der Gewichtsverlauf in Abb. 14 zeigt. Die Wichtigkeit der zweimaligen Gabe wird daraus klar, daß eine fünffach höhere LCV-Dosis ($1 \times 100 \text{ mg/kg KG}$) als die Gesamtdosis von 2 Applikationen ($2 \times 10 \text{ mg/kg KG}$) keine Wirkung als Einzelgabe zeigte, gleichgültig ob das Mittel nach der 1. oder 2. MTX-Injektion verabreicht wurde.

Es ist zwar ein geringer Erfolg zu beobachten, wenn LCV einmal nach der 2. und nicht nach der 1. MTX-Applikation gegeben wurde, doch ist dieser Unterschied nicht signifikant.

Durch die Verabreichung von LCV nach jeder MTX-Injektion wurde ein Teil der MTX-Toxizität coupiert, die toxische Wirkung aber nicht völlig beseitigt. Die verbliebene Resttoxizität verursachte nurmehr reparable Organschäden, die der Gesamtorganismus überstehen konnte, wenn ihm genügend Zeit zur Reparation gelassen wurde. Folgten aber immer wieder neue Schäden bevor eine vollständige Re-

paration möglich war, so war schließlich der Organismus nicht mehr fähig, diese Summation zu überstehen. Durch die Ergebnisse der Tests in 3.3.3. und den Gewichtsverlauf in Abb. 16 wird dies verdeutlicht.

Leucovorin bringt die durch MTX gehemmten biochemischen Abläufe in der Zelle wieder in Gang, so daß die Zellen ihre Lebensfunktionen anschließend durch de novo synthetisierte DHFR selbst unterhalten können. Eine weitere Schädigung oder eine stärkere Vorschädigung (wie z.B. wenn LCV erst nach der 2. MTX gegeben wird) können durch eine LCV-Gabe allein in diesem reduzierten Zustand der Zellen nicht ausgeglichen werden. Auch die höhere Dosis (100 mg/kg KG) kann wie die niedrigere (10 mg/kg KG) wegen des raschen Verbrauchs und der Ausscheidung nur eine Hilfe zur Selbsthilfe der Zellen sein.

Um den Erfolg von LCV nicht durch die Hemmung von de novo synthetisierter DHFR durch restliches freies MTX in der Zelle zunichte zu machen, muß der freie MTX-Spiegel ziemlich abgesunken sein.

Beim Menschen ist es deshalb erst sinnvoll, LCV einzusetzen, wenn der MTX-Serumspiegel auf Werte unterhalb 10^{-6} mol abgesunken ist (21).

4.2.2.3. Einfluß der Knochenmarkstransplantation auf die Letalität nach fraktionierter MTX-Gabe

Wie die Ergebnisse in Tab. 11 zeigen, hatte die Knochenmarkstransplantation keinerlei Einfluß auf die Letalität der Tiere nach MTX-Gabe. Bei einer Dosierung von 5 x 20 mg MTX/kg KG starben alle Tiere mit und ohne Knochenmarkstransplantation.

Läßt man die Gruppe mit Adenocarcinom, die bei einer Dosierung von 5 x 10 mg MTX/kg KG - 12 Std. eine Letalität von 9/10 erreichte, außer acht, so ergibt sich bei

den anderen Gruppen mit und ohne Knochenmarkstransplantation im Bezug auf die Letalität kein signifikanter Unterschied. Die Letalität erreichte bei den Gruppen mit Knochenmarkstransplantation 5% (1/20), bei den Gruppen ohne Knochenmarkstransplantation 6,2% (1/16 - vgl. Tab. 11 Seite 40. Die genannten Zahlen setzen sich aus der Summe der transplantierten bzw. nicht transplantierten Tiere zusammen). Auf Grund der Testergebnisse und dem Todeszeitpunkt der Mäuse kann geschlossen werden, daß eine Knochenmarksdepression nicht ursächlich für den Tod der Tiere verantwortlich ist. Der hämatopoetische Tod würde, wie aus radiologischen Untersuchungen bekannt ist, bei Mäusen erst zwischen dem 10. und 15. Tag nach Behandlung eintreten (12). Auch Untersuchungen von Zaharko (30, 31) über die UdR-Inkorporation nach MTX haben ergeben, daß die relative Toxizität von MTX bei Mäusen im Darm größer ist als im Knochenmark.

4.3.1. Pathophysiologie der toxischen Wirkung

Die Verteilung von MTX in den einzelnen Organen ist abhängig von der Existenz bzw. vom Fehlen des von MTX benutzten spezifischen Transportmechanismus. So ist die Penetration von MTX in Fett- oder Muskelgewebe sowie in das Gehirn sehr gering. Hingegen wird MTX sehr rasch in die Niere, Leber und Darmschleimhaut aufgenommen, wobei beachtliche Spiegel in diesen Organen erreicht werden (2).

Zwei Stunden nach s.c. Applikation werden bei Mäusen maximale Wirkspiegel von MTX im Darm gemessen. Dies ist zu einem Zeitpunkt, da der Plasmaspiegel bereits wieder auf 1/5 bis 1/10 seines höchsten Wertes abgesunken ist (25).

Nach i.v. Gabe von MTX in die Schwanzvene kommt es bei Mäusen zu einer raschen und starken Anreicherung in Darm und Leber. Margolis et al. (19) erhielten zwei Stunden nach i.v. Applikation von 50 mg, 5 mg, 0,5 mg/kg KG im Darm Konzentrationen von 147 000 ng/g, 21 300 ng/g und 1 400 ng/g und in der Leber von 4 970 ng/g, 1 400 ng/g und 900 ng/g. Die zum gleichen Zeitpunkt gemessene Plasmakonzentration von MTX betrug 500 ng/ml, 200 ng/ml bzw. 100 ng/ml.

Ähnlich wie aus dem Plasma wird MTX bei Mäusen in zwei Phasen aus den Organen ausgeschieden. Zwischen der 2. und 12. Stunde p.i. sinkt der MTX-Spiegel im Darm und in der Leber ziemlich rasch ab. Etwa um die 12. Stunde p.i. werden in den Organen Konzentrationen gemessen, die der Plasmakonzentration 2 Stunden nach Applikation entsprechen. In der folgenden Phase wird MTX nur in geringem Maß aus den Organen freigesetzt, so daß nach 72 Stunden für die oben genannten MTX-Dosen noch Konzentrationen im Darm zwischen 50 ng/g und 150 ng/g gefunden werden (19). Diese Werte zeigen, daß MTX in

der Leber und im Darm sowohl in großer Menge, als auch über einen längeren Zeitraum verfügbar ist.

Wie die Wirkungslosigkeit der Knochenmarkstransplantation, der Todeszeitpunkt der Tiere und die Histologie des Dünndarms demonstrieren, ist der Dünndarm der limitierende Faktor in der Behandlung von Mäusen mit MTX. Für die schädigende Wirkung im Gastro-Intestinal-Bereich, die letztlich zum Tod der Tiere führt und die mit Knochenmarksdepression und Leberzellschädigung beim Menschen zu den hauptsächlichsten Nebenwirkungen zählt (3), ist der Synergismus von drei Faktoren verantwortlich:

1. Die Anwesenheit des von MTX benutzten aktiven Transportmechanismus im Darm.

Durch diesen Transportmechanismus kommt es in den Schleimhautzellen zur Anreicherung von MTX. Auf Grund dieser Anreicherung bleiben trotz des folgenden MTX Efflux aus den Zellen und dem damit verbundenen Absinken des Wirkspiegels über eine längere Zeit wirksame Konzentrationen in den Zellen.

2. Der biliäre Kreislauf.

Nur eine relativ geringe Menge an MTX wird über den Stuhl abgegeben (1-2%). Eine wesentlich höhere Menge wird aber biliär sezerniert, wovon der größte Teil wieder durch den Darm rückresorbiert wird. Somit ist der Darm ständig dem in der Leber konzentrierten MTX ausgesetzt.

3. Die hohe Proliferationsrate.

Der Darm gehört zu jenen Geweben mit sehr hoher Proliferationsrate und ist daher durch MTX äußerst gefährdet. Der Anteil proliferierender Zellen (growth fraktion) beträgt in den Darmkrypten 100% und auch die Generationszeit ist mit 9 - 14 Stunden sehr kurz.

Durch die Zerstörung der gastrointestinalen Schleimhaut kommt es bei den Mäusen nach Gabe von MTX ähnlich wie nach Bestrahlung zu einem gastrointestinalen Syndrom mit Anorexie und blutiger Diarrhoe. Die Denudation der Darmzotten führt zu einer Exsudation von Plasma und zu einem Elektrolytverlust, der durch die Diarrhoe verstärkt wird. Die Exsiccose und der Elektrolytverlust bringen die Tiere schließlich in einen Volumenmangelschock, an dem die Tiere dann sterben.

4.3.2. Proliferation der Dünndarmschleimhaut

Das Darmepithel beim Menschen und bei den meisten Säugetieren besteht aus einer einzigen Schicht hochprismatischer Zellen, die die innere Oberfläche des Duodenum, des Jejunum und des Ileum auskleidet. Die absorptive Fläche des Darms wurde durch die Zotten, fingerförmige Ausstülpungen in das Darmlumen, erheblich vergrößert. Jede Zotte ist von Krypten umgeben, röhrenförmige Vertiefungen, die am unteren Ende geschlossen sind und zum Darmlumen hin eine Öffnung besitzen (18, 26).

Die Regeneration des Darmepithels geht von den Krypten aus, denn nur in den Krypten finden Zellteilungen statt. Durch Migration gelangen die Zellen aus den Krypten und entlang den Zotten zu den Zottenspitzen, wo sie dann in das Darmlumen abgeschilfert werden. Die Migration der Zellen wird dadurch erklärt, daß bei der Teilung einer Zelle in der Krypte die übrigen Zellen, die sich oberhalb der teilenden Zelle befinden, um eine Position weiter in Richtung auf die Zottenspitze zugeschoben werden.

Die Neuproduktion von Zellen in den Krypten und das Absterben der Zellen an der Zottenspitze bilden ein

Fließgleichgewicht. Alle Zellen in den Krypten sind, solange sie unterhalb der Grenze liegen, an der sie mit der Zellteilung aufhören, an der Proliferation beteiligt. Die Migration der Zellen aus den Krypten zur Zottenspitze dauert beim Menschen etwa 3 Tage (Transitzeit), bei der Ratte etwa 36 Stunden (16). Ebenso ist die Zykluszeit der Zellen in den Krypten sehr kurz. Beim Menschen beträgt sie zwischen 9 und 14 Stunden, bei der Ratte und bei der Maus um 10 Stunden. Am längsten dauert dabei die S-Phase; die G₁-Phase nimmt nur etwa 2 - 3 Stunden in Anspruch (26).

Durch die zytostatische Wirkung von MTX wird das Fließgleichgewicht des Darmepithels gestört. Die fehlende Neuproduktion von Zellen läßt, da die Zellabschilferung weiter geht, die Krypten und Zotten schrumpfen. Bei letalen Dosen kann dies bis zur völligen Entblößung des Darmes führen. Nach subletalen MTX-Gaben dauert dieser Prozess bei der Ratte bis zu 4 1/2 Tage nach der Injektion an. Daran schließt sich eine Erhohlungsphase des Epithels an, das erst am 7. Tag p.i. seine normale Morphologie wieder erreicht (15).

4.3.3. Zelluläre Erklärung der MTX-Toxizität

MTX ist ein in der S-Phase wirksames Zytostatikum, das über die spezifische Hemmung der DHFR zu einer weitgehenden Hemmung der Thymidin- und Purinsynthese führt. Dadurch wird die Neuproduktion von DNA und somit die Reduplikation der Zelle verhindert. Die MTX Wirkung ist aber nicht nur allein eine Folge der mangelnden DNA-Synthese, denn durch den Folsäuremangel werden auch eine Reihe anderer für die Zelle lebenswichtige biochemische Prozesse wie die RNA-Synthese oder die Proteinsynthese gestört (3, 19). Es handelt sich also um einen komplexen Mechanismus, der zum Zelltod führt.

Entscheidend für das Schicksal der Zelle ist die Dauer der Enzymhemmung. Diese ist sowohl abhängig von einer über längere Dauer frei verfügbaren intrazellulären MTX Menge und somit von der applizierten Dosis, als auch von der Neusynthese der DHFR durch die Zelle, soweit dies wegen der RNA- und Proteinsynthesehemmung überhaupt möglich ist.

Bereits nach geringen MTX-Dosen (0,5 mg/kg KG) sinkt der titrierbare DHFR-Spiegel im Darm von Mäusen während der ersten 8 Stunden nach der Injektion auf kaum messbare Werte ab. Erst 16 Stunden p.i. ist ein Anstieg des Enzymspiegels zu sehen. Die Normwerte werden aber frühestens nach 72 Stunden erreicht. Bei höheren Dosen (50 mg/kg KG) ist die Erholungsphase länger und es können auch bereits durch Zelltod verursachte aber reparable Organschäden beobachtet werden (19). Als Folge der Enzymhemmung kommt es zu einer Hemmung der DNA-Synthese, deren Dauer ebenso wie die Hemmung der DHFR von der Dosis abhängig ist (19). Schon durch eine Dosis von 0,5 mg/kg KG tritt eine Hemmung der DNA-Synthese im Mäusedarm von mindestens 2 Stunden ein, ohne daß intestinale Schäden zu beobachten wären.

Um erkennbare Schädigungen am Darm hervorzurufen, ist eine DNA-Synthesehemmung von mindestens 16 Stunden notwendig, was der Wirkung einer MTX-Dosis von 50 mg/kg KG entspricht. Hierdurch wird eine anhaltende Verminderung der Mitoseaktivität verursacht und es werden auch zelluläre Veränderungen in Form von degenerativ veränderten Zellen in den Krypten beobachtet. Ferner kommt es zur Atrophie des Zottenepithels und zu intestinalen Nekrosen, ohne jedoch irreparable Schäden zu hinterlassen (19). Der toxische Tod tritt bei den Mäusen auf, wenn die DNA-Synthesehemmung im Darm länger als 25 bis 30 Stunden dauert (24). Eine Erholung der Syntheseaktivität im Dünndarm ist nur bei Dosen unterhalb 400 mg/kg KG möglich (24).

Ein Vergleich von MTX mit anderen selektiven Inhibitoren der DNA-Synthese wie Hydroxyharnstoff und Cytosinarabinosid zeigt, daß bei gleicher Dauer der DNA-Synthesehemmung die schädigende Wirkung im Mäusedarm durch MTX erheblich geringer ist. Während eine zweistündige DNA-Synthesehemmung durch MTX keinerlei sichtbare Schäden im Darm verursacht, treten nach Verwendung der oben genannten Substanzen innerhalb weniger Stunden degenerativ veränderte Zellen in den Darmkrypten auf und es kommt im weiteren Verlauf zu schwerwiegenden Organveränderungen (19).

Die unterschiedliche Wirkung von MTX und spezifischen DNA-Syntheseinhibitoren auf die proliferierenden Zellen in den Krypten könnte ihre Ursache in der Behinderung multipler biochemischer Prozesse haben, die alle für ihren ungestörten Ablauf Folsäure benötigen. Durch das rasche Absinken der Folsäure in den Zellen kommt es sehr rasch über die Hemmung der Purinsynthese und der Überführung von Desoxyuridinmonophosphat zu Desoxythymidinmonophosphat zur DNA-Synthesehemmung. Gleichzeitig tritt auch noch

eine Hemmung der Aminosäuresynthese, Proteinsynthese und RNA-Synthese ein. Die gleichzeitige Behinderung der DNA-Synthese und der Proteinsynthese könnte möglicherweise der Grund dafür sein, daß es durch MTX nicht zu einem solch raschen Untergang der S-Phasezellen kommt wie bei selektiver DNA-Synthesehemmung durch C-Arabinosid oder Hydroxyharnstoff (19).

Diese Erkenntnis und das Wissen über die Interferenz der DNA-, RNA-, Protein- und Aminosäuresynthese führte zur Theorie der Selbstbegrenzung der MTX-Wirkung (3, 30). Dieses Phänomen wäre das Resultat einer allgemeinen Verlangsamung der Zykluspassage, sowie der Retention proliferierender Zellen in der G_1 -Phase, wodurch verhindert wird, daß Zellen durch das Weiterschreiten im Zyklus in die sensitive S-Phase gelangen (3, 30). Durch diesen Mechanismus käme es zu einer partiellen Synchronisation im zyklischen Verhaltensmuster der Zellen, wenn sie nach Absinken der Hemmkonzentration unter den kritischen Wert wieder beginnen zu proliferieren (30).

Dies sei nachfolgend genauer erklärt:

Vor einer Zytostatischen Behandlung besitzt eine wachsende Zellpopulation ein stabiles Verteilungsmuster der Zellen im Zyklus (siehe Abb. 23 a). Durch Anwendung eines phasenspezifischen Zytostatikum wie MTX wird dieses Verteilungsmuster verändert, da die gerade in der sensitiven Phase befindlichen Zellen durch das Medikament abgetötet werden (Abb. 23 b). Im weiteren Verlauf werden dann die Zellen, die in der G_2 -Phase überlebten in die G_1 -Phase übergehen, da ein G_2 - oder Mitoseblock nicht besteht. Die Überlebenden Zellen der G_1 -Phase werden aber durch MTX weitgehend an der Transition in die drogensensitive S-Phase gehindert und somit vor dem Zelltod bewahrt. Darin ist die Ursache für die Selbstbegrenzung der MTX-Wirkung zu sehen. Zugleich

kommt es zu einer Akkumulation der Zellen in der G_1 -Phase (Abb. 23 c). Nach Absinken der Hemmkonzentration setzen die Zellen die normale Zykluspassage fort. Auf Grund der Arretierung der Zellen in der G_1 -Phase kommt es nun zu einem teilweise synchronisierten Verhalten der Zellen, weil ein größerer Zellpool gleichzeitig in die S-Phase überwechselt (Abb. 23 d). Erst allmählich stellt sich dann die normale Wachstumsverteilung wieder ein (26).

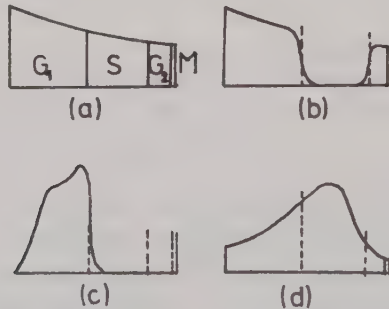


Abb. 23: Diagrammatische Darstellung des Effekts eines S-Phasen spezifischen Zytostatikums auf die Altersverteilung proliferierender Zellen in einer exponentiell wachsenden Population. Die Diagramme beziehen sich auf die überlebenden Zellen. Sie zeigen die Tötung der Zellen in der S-Phase (b), sowie den kurzzeitigen G_1 -S Block (c) und die daraus resultierende partielle Synchronisation (c + d). - Nach Steel/26.

Die These der Selbstbegrenzung von MTX steht im Gegensatz zu den Erkenntnissen von Eichholz und Trott (9), die in einem in vitro Versuch den Verlauf des Zelltodes unter MTX an B-14 Zellen untersucht haben. Danach werden chinesische Hamsterzellen der G_1 -Phase durch MTX für wenigstens 148 Stunden nicht gehindert, in die drugensensitive S-Phase zu wechseln. Da die Überlebensrate mit größer werdender Expositionsdauer exponentiell abnimmt, und zwar bis zu Überlebensfraktionen, die wesent-

lich unterhalb dem Markierungsindex liegen, müssen trotz der ständigen Anwesenheit von MTX Zellen getötet worden sein, die erst in die S-Phase gelangt sein mußten.

4.3.4. Vergleich der Strahlenwirkung auf den Darm

Werden die Veränderungen, die bei Mäusen nach letalen MTX-Dosen auftreten mit den Folgen hochdosierter Ganzkörperbestrahlungen verglichen, so zeigt sich, daß beide Behandlungsarten die gleichen Auswirkungen haben. Sowohl die histologischen Veränderungen am Darm, die klinische Symptomatik und der Todeszeitpunkt der Tiere entsprechen sich.

Mäuse, die mit mehr als 1000 rad. Ganzkörperdosis bestrahlt werden, sterben zwischen dem 4. und 7. Tag nach Bestrahlung an den Folgen des gastrointestinalen Syndroms (1, 7, 12). Die charakteristischen Symptome sind Lethargie, Anorexie, Gewichtsverlust und blutige Diarrhoe. Die Tiere sterben letztlich an der Dehydratation und am Elektrolytverlust, die durch die Exsudation von Plasma in das Darmlumen hervorgerufen werden. Die klinische Symptomatik und der nachfolgende Tod haben ihre Ursache in der Destruktion des gastrointestinalen Epithels und in der Erschöpfung der Stammzellen in der kritischen Phase der Organerneuerung durch die Bestrahlung.

Wird der Darm von Mäusen nach Bestrahlung zum gleichen Zeitpunkt untersucht wie die eigenen histologischen Präparate, die nach MTX-Gabe angefertigt wurden, so findet man beidesmal die selben Veränderungen: Die Krypten haben wieder ihre normale Länge und der Epithelsaum in den Krypten ist völlig regeneriert. Die Destruktion der Zotten hat aber ihr Maximum erreicht. Die Zotten sind verkürzt und die Zelldichte der Zottenoberfläche hat abgenommen (1,5,29).

Zusammenfassung:

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß die Wirkung von MTX weniger von der Dosis als vielmehr von der Minwirkdauer des Medikaments bestimmt wird. Während Einzeldosen bis 400 mg/kg KG keine Todesfälle unter den Tieren verursachten, starben bei fraktionierter Applikation von einem Achtel der höchsten Einzeldosis bereits 38,5% der Tiere.

Auch bei unterschiedlichen Fraktionierungsschemen konnte festgestellt werden, daß nicht so sehr die Dosis den Ausschlag für den Tod der Mäuse gab, sondern daß die größte Bedeutung dem Zeitfaktor zu kam. Die höchste Letalitätsrate konnte erreicht werden, wenn das Medikament über einen Zeitraum von 12 - 14 Stunden gegeben wurde. Voraussetzung war natürlich, daß die Schwellendosis von ca. 50 mg/kg KG überschritten wurde. Dagegen war es von geringer Bedeutung, ob die gleiche Gesamtdosis über diesen genannten Zeitraum in zwei oder mehreren Fraktionen verabreicht wurde.

Eine deutliche Senkung der Letalität und eine Verringerung der toxischen Nebenwirkungen nach zwei MTX-Injektionen von je 100 mg/kg KG im Abstand von 14 Stunden brachte die Gabe von LCV. Dabei war es äußerst wichtig, daß LCV nach jeder MTX-Gabe verabreicht wurde. Eine LCV-Dosis die 1/10 der MTX-Dosis entsprach genügte, um die Tiere vor dem sicheren Tod zu bewahren. Der Zeitabstand zwischen den MTX und LCV-Injektionen konnte zwischen 1 und 12 Stunden variiert werden ohne daß sich Folgen zeigten.

Die fünffach höhere Gesamtdosis an LCV (äquivalent einer MTX Injektion) konnte dagegen als Einzelgabe nach der ersten oder der zweiten MTX-Applikation nicht verhindern, daß die Tiere starben.

Es konnte ferner demonstriert werden, daß die Nebenwirkungen von MTX bei jeweils nachfolgender LCV-Gabe (entsprechend 1/10 der MTX-Dosis) nur reduziert, aber nicht völlig beseitigt werden, da nach wiederholten MTX und LCV Applikationen die Restwirkung durch die Summation zu kontinuierlichen Gewichtsverlusten und letztlich zum Tod der Tiere führten.

Die Transplantation von Knochenmark bei behandelten Tieren brachte hinsichtlich einer Verringerung der letalen Nebenwirkungen von MTX keinen Erfolg. Wie der Todeszeitpunkt der Tiere, die Histologie des Darms und der Vergleich mit Ergebnissen bestrahlter Tiere zeigen ist nicht die Insuffizienz des hämatopoetischen Systems für den Tod der Tiere verantwortlich, sondern die Störung der Regeneration des Darmepithels.

Abkürzungsverzeichnis:

Adc.	Adenocarcinom
ATP	Adenosintriphosphat
CTP	Cytidintriphosphat
DHFR	Dihydrofolsäurereductase
DNA	Desoxyribonucleinacid
dUMP	Desoxyuridinmonophosphat
FH ₂	Dihydrofolsäure
FH ₄	Tetrahydrofolsäure
Fs.	Fibrosarkom
Gew.	Gewicht
GTP	Guanosintriphosphat
KG	Körpergewicht
LCV	Leucovorin = 5-Formyl-Tetrahydrofolsäure = 5-CHO-FH ₄
LD	Letaldosis
Let.	Letalität
min.	minimalst
MTX	Methotrexat = Amethopterin
p.i.	post iniectiōnem
RNA	Ribonucleinacid
s	Standartabweichung
TMP	Thymidinmonophosphat
TTP	Thymidintriphosphat

Literaturverzeichnis

- 1 BEROJIS Charles C.: Pathology of Irradiation. Baltimore, Williams & Wilkins, 1971
- 2 BERTINO Joseph R.: Folate Antagonists. Aus A.C. Sartorelli u. D.G. Johns: Antineoplastic and Immunosuppressive Agents, Part II Chapter 52, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1975
- 3 BLEYER W. Archie: The clinical Pharmacology of Methotrexate. Cancer 41:36 - 51, 1978
- 4 BORSA J., WHITMORE G.F., VALERIOTE F.A., COLLINS D., BRUCE W.R.: Studies on the Persistence of Methotrexate, Cytosine Arabinoside, and Leucovorin in Serum of Mice. J. National Cancer Institute Vol. 42, No. 2 February 1969/235-242.
- 5 CAIRNIE A. B., MILLEN B.H.: Fission of Crypts in the small Intestine of irradiated Mouse. Cell Tissue Kinet. (1975) 8, 189 196.
- 6 CHABNER B.A., JOHNS D. G., BERTINO J.R.: Enzymatic Cleavage of Methotrexate provides a Method for Prevention of Drug Toxicity. Nature Vol. 239 Oktober 13 1972 395-397.
- 7 DIETHELM L., OLSON O., STRAND F., VIETEN H., ZUPPINGER A.: Handbuch der medizinischen Radiologie. Band II, Teil II. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1966
- 8 DJERASSI I.: High-Dose Methotrexate (NSC - 740) and Citrovorum Factor (NSC 3590) Rescue: Background and Rationale. Cancer Chemotherapy Reports Part 3 Vol. 6, No. 1, July 1975
- 9 EICHHOLZ H., TROTT K.R.: Methotrexate: The Effect of Drug Concentration and Exposure Time on Mammalian Cell Survival in vitro. B.J. Cancer (1980) 41, 277-284
- 10 FREEMAN-NARROJ M.: The Pharmacology of Methotrexate In: Porter, R. & Wiltshaw E.: Methotrexate in the Treatment of Cancer. Bristol, J. Wright & Sons, 1962.

- 11 GRUBER H.: Die Wirkung von Methotrexat auf das Fibrosarkom und das Adenocarcinom der weiblichen C₃H-Maus. Dissertationsarbeit München 1981
- 12 HALL E.J.: Radiology for the Radiologist. Hagerstown, Harper & Row, 1973
- 13 HENDERSON E.S., ADAMSON R.H., OLIVERO V.T.: The Metabolic Fate of Tritiated Methotrexate. II. Absorption and Excretion in Man. Cancer Res. 25:1018-1024/1965.
- 14 HRYNIAK W.M.: Purineless Death as a Link between Growth Rate and Cytotoxicity by Methotrexate. Cancer Res. 32: 1506-1511, July 1972
- 15 JEYNES B.J., ALTMANN G.G.: Light and Scanning Electron Microscopic Observations of the Effects of Sublethal Doses of Methotrexate on the Rat Small Intestine. Anat. Rec. Vol. 191 No. 1 May 1978/1-18.
- 16 LAMERTON L.F.: Cell proliferation and the differential response of normal and malignant tissues. British Journal of Radiology, 45, 161-170 1972.
- 17 Lederle Cyanamid GmbH. München: METHOTREXAT, Folsäureantagonist, Zytostatikum aus der Reihe der Antimetaboliten mit Antidot LEUCOVORIN, aktive Form der Folsäure. Ausgabe März 1975
- 18 LEONHARDT H.: Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen. 4. Aufl. 1973 Georg Thieme Verlag Stuttgart.
- 19 MARGOLIS S., PHILIPS F.S., STERNBERG S.S.: The Cytotoxicity of Methotrexate in Mouse Small Intestine in Relation to Inhibition of Folic Acid Reductase and of DNA Synthesis. Cancer Res. 31:2037-2046. Dec. 1971
- 20 PHILIPS F.S., SIROTNIAK F.M., SODERGREN J.E., HUTCHISON D.J.: Uptake of Methotrexate, Aminopterin and Methasquin and Inhibition of Dihydrofolate Reductase and of DNA Synthesis in Mouse Small Intestine. Cancer Res. 33: 153-158, Jan. 1973.

- 21 SAUER H., SCHALLHORN A., WILMANNS W.: Zum bio-chemischen Mechanismus des Citrovorumfaktorschutzes nach hochdosierter Methotrexatbehandlung maligner Tumoren. Therapie Woche 28, 7809 7814 (1978) 42
- 22 SAUER H., WILMANNS W.: Adjuvante Chemotherapie des osteogenen Sarkoms mit High-Dose Methotrexat/Leucovorin: Biochemische Effekte auf die DNA-Synthese der Knochenmarkszellen. Blut 36, 357-361 (1978).
- 23 SHEWELL J.: The Effect of Methotrexate on Spontaneous Mammary Adenocarcinomata in Female C₃H Mice. Br.J. Cancer (1976) 33, 210.
- 24 SIROTNAK F.M., DONSBACH R.C.: Differential Cell Permeability and the Basis for Selektive Activity of Methotrexate during Therapy of L1210 Leukemia. Cancer Res. 33:1290-1294, June 1973.
- 25 SIROTNAK F.M., DONSBACH R.C., DORICK D.M., MOCCIO D.M.: Tissue Pharmacokinetics, Inhibition of DNA Synthesis, and Tumor Cell Kill after High-Dose Methotrexate in Murine Tumor Models. Cancer Res. 36:4672-4678, Dec.1976.
- 26 STEEL G. G.: Growth kinetics of tumors. Claredon Press 1977 Oxford
- 27 WERKHEISER W.C.: The Biochemical, Cellular and Pharmacological Action and Effects of the Folic Acid Antagonists. Cancer Res. 23:1277-1285, Sept. 1963.
- 28 WILMANNS W.: Antimetabolite. Der Internist Band 12,1. Zusatzheft 1971 S. 127-135.
- 29 WITHERS H.R.: Regenerations of Intestinal Mucosa after Irradiation. Cancer July 1971 Vol. 28/75 81.
- 30 ZAHARKO D.S., DEDRICK R.L., PEALE A.L., DRAKE J.C., LUTZ R J.: Relative Toxicity of Methotrexate in Several Tissues of Mice bearing Lewis Lung Carcinoma. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics Vol. 189, No. 3 585 592.
- 31 ZAHARKO D.S., Wing- PUN FUNG, KIN-HAI YANG: Relative Biochemical Aspects of Low and High Doses of Methotrexate in Mice. Cancer Res. 37:1602-1607, June 1977.

Lebenslauf

Am 24.12.1951 wurde ich, Josef Ruf, als das dritte Kind der Eheleute Josef und Brigitte Ruf, geb. Herwegh in Dillingen/Donau geboren.

Von 1958 bis 1963 besuchte ich die Volksschule in Dillingen. Anschließend trat ich in den neusprachlichen Zweig des Johann-Michael-Sailer Gymnasiums in Dillingen über und bestand dort 1972 das Abitur.

Nach dem Abitur leistete ich den Grundwehrdienst bei der Bundeswehr als Sanitäter ab.

Von Oktober 1973 bis März 1974 arbeitete ich als Krankenpflegehelfer im Nervenkrankenhaus in Günzburg.

Das Studium der Humanmedizin begann ich im Sommersemester 1974 an der Ludwig Maximilians - Universität in München und beendete es dort mit der 3. ärztlichen Prüfung im Mai 1980.

Im August 1980 heiratete ich die Ärztin Sok Hia Lie.

Seit dem 1. Januar 1981 bin ich als Assistenzarzt in der chirurgischen Abteilung des Kreiskrankenhauses Wertingen tätig.

